



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DAS LECTINAS DE
Canavalia brasiliensis (ConBr) E DE *Canavalia ensiformes* (ConA) EM
PREPARAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E EM CÉLULAS
TUMORAIS

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Samira Fabre Pereira

Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC

Fevereiro de 2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DAS LECTINAS DE
Canavalia brasiliensis (ConBr) E DE *Canavalia ensiformes* (ConA) EM
PREPARAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E EM CÉLULAS
TUMORAIS

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Samira Fabre Pereira

Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC

Fevereiro de 2005

“CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DAS LECTINAS DE *Canavalia
brasilensis* (ConBr) E DE *Canavalia ensiformes* (ConA) EM PREPARAÇÕES DO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL E EM CÉLULAS TUMORAIS”

SAMIRA FABRE PEREIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurofisiologia.

Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Coordenadora do Curso

Profa. Dra. Andréia Trentim

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal (Presidente)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC

Prof. Dr. Márcio Alvarez-Silva
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética– CCB – UFSC

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus em primeiro lugar pela oportunidade de viver.

Agradeço ao meu marido Giuber, por ter me agüentado, me esperado e por ter me dado força em todos os momentos.

Agradeço à minha família, principalmente a ajuda de meu pai e a minha querida mãe, por tudo que vêm fazendo por mim.

Ao professor e orientador Rodrigo, que me aceitou, mesmo não me conhecendo e pode me ajudar a desenvolver este trabalho.

Aos professores Carla Inês Tasca, Nelson H. Gabilan e Ana Lúcia Rodrigues pelos empréstimos de equipamentos e alguns materiais e pelas dicas oferecidas.

À todos os professores e amigos de turma, pelas aulas agradáveis que tivemos.

À todos do laboratório pela boa convivência e amizade: Camila, Thaís, Patrícia Stoco, Sandro, Cris, Tiago, Helena, Carina, Rossana e especialmente, à Bettina que me ajudou com muita força de vontade na reta final deste trabalho.

Aos colegas Ricardo e Marco, por terem me ajudado a desenvolver parte do trabalho.

Aos professores Andréia Trentim e Márcio, por terem permitido que parte do trabalho fosse feito em seus laboratórios.

Ao professor João Batista Calixto, por ter permitido o uso do cintilador líquido, equipamento essencial para as medidas de liberação de glutamato desenvolvidas neste trabalho.

Ao Nivaldo, secretário da Pós-graduação em Neurociências, pela sua dedicação aos alunos.

À CAPES pela bolsa que financiou parte do período do curso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1- INTRODUÇÃO.	1
1.1 - LECTINAS.....	1
1.1.1 - Lectina das sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr).....	3
1.2 - TRANSMISSÃO SINÁPTICA.....	5
1.2.1 - Transmissão glutamatérgica.....	8
1.2.2.- Toxinas na liberação de neurotransmissores.....	10
1.3- SINALIZAÇÃO CELULAR	12
1.3.1 - Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK)..	13
1.4 - LECTINAS E CÉLULAS TUMORAIS.....	17
1.5- JUSTIFICATIVA.....	18
2- OBJETIVOS	20
2.1- OBJETIVO GERAL.....	20
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3- MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1- ANIMAIS.....	22
3.2- MATERIAS	22
3.3- EQUIPAMENTOS	23
3.4 - PREPARAÇÃO DE FRAÇÃO SINAPTOSSOMAL.	24
3.5 - ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE L-[³ H] GLUTAMATO.	24
3.6 - VIABILIDADE DAS FRAÇÕES SINAPTOSSOMAIS.....	25
3.7- PREPARAÇÃO DE FATIAS HIPOCAMPAIS	24

3.8- VIABILIDADE DAS FATIAS HIPOCAMPAIS	27
3.9 - CULTURA DE CÉLULAS.....	27
3.9.1 - Linhagem de glioma C6.....	27
3.9.2 - Linhagem linfoma humano U-937.....	28
3.10 - VIABILIDADE CELULAR.....	28
3.11 - SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS	29
3.12 - ELETROTRANSFERÊNCIA E IMUNODETECÇÃO	30
3.13- DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	32
3.14- ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4- RESULTADOS	33
4.1- ESTUDOS DOS EFEITOS DE CONBr E CONA <i>IN VITRO</i> NA LIBERAÇÃO DE L-[³ H] GLUTAMATO EM SINAPTOSSOMAS DE RATAS ADULTAS.	34
4.1.1- AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-[³ H] GLUTAMATO EM CONDIÇÕES BASAIS NA PRESENÇA DA LECTINA CONBr	34
4.1.2 - AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-[³ H] GLUTAMATO EM CONDIÇÕES BASAIS NA PRESENÇA DA LECTINA CONA	37
4.1.3 - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SINAPTOSSOMAS TRATADOS COM A LECTINA CONBr.	37
4.1.4 - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SINAPTOSSOMAS TRATADOS COM A LECTINA CONA...	40
4.1.5 - AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-[³ H] GLUTAMATO ESTIMULADA POR KCl NA PRESENÇA DE CONBr.....	40
4.1.6 - AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE L-[³ H] GLUTAMATO ESTIMULADA POR A-LATROTOXINA NA PRESENÇA DE CONBr	43
4.1.7 - DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DE MAPKS POR CONBr E CONA	45
4.1.7.1 - Análise da Fosforilação de ERK1/2 em Sinaptossomas de Ratas Adultas Incubadas com ConBr <i>in vitro</i>	45
4.1.7.2 - Análise da Fosforilação de ERK1/2 em Sinaptossomas de Ratas Adultas Incubadas com a lectina ConA <i>in vitro</i>	50
4.1.7.3 - Análise da Fosforilação de JNK 1/2 em Sinaptossomas de Ratas Adultas Incubadas com ConBr <i>in vitro</i>	54
4.2. ESTUDOS DOS EFEITOS DE CONBr E CONA <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO FATIAS HIPOCAMPAS DE RATAS ADULTAS	58

4.2.1 - ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATAS ADULTAS EXPOSTAS ÀS LECTINA CONBr E CONA.....	58
4.2.2 - DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DE ERK 1/2 EM FATIAS HIPOCAMPAS INCUBADAS COM A LECTINA CONBr	60
4.3. ESTUDOS DOS EFEITOS DAS LECTINAS CONBr E CONA <i>IN VITRO</i> EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS C6 E U-937.....	64
4.3.1 - ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CÉLULAS C6 TRATADAS COM CONBr E CONA.....	64
4.3.2 - ANÁLISE DA FOSFORILAÇÃO DE ERK1/2 EM CÉLULAS C6 TRATADAS COM CONBr E CONA	67
4.3.3 - ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CÉLULAS U-937 TRATADAS COM CONBr	70
5- DISCUSSÃO	73
6 - CONCLUSÕES.....	85
PERSPECTIVAS	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura global do tetrâmero de ConBr e a relativa localização das quatro	4
Figura 2 - Transmissão sináptica entre um neurônio e outro por meio de zonas de contato especializadas denominadas sinapses (<i>Adaptado de Bear et al., 2002</i>)	6
Figura 3 - Desenho esquemático da preparação de terminais sinápticos isolados (sinaptossomas)(<i>Adaptado de Phelan & Gordon Weeks, 1992</i>).....	8
Figura 4 - Cascata de sinalização de MAPK.....	15
Figura 5 - Imunodeteção, através de quimiluminescência, de um polipeptídeo usando anticorpo específico.	32
Figura 6 - Curva de tempo e dose-resposta da liberação de L-[³ H] glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas na presença ou ausência de ConBr e KCl..	35
Figura 7 - Curva de tempo e dose-resposta da liberação de L-[³ H] glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas na ausência de glicose e na presença ou ausência de ConBr e KCl.....	36
Figura 8 - Curva de tempo e dose-resposta da liberação de L-[³ H] glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas na presença ou ausência de ConA e KCl...	38
Figura 9 - Liberação de LDH em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas incubados com ConBr e KCl.....	39
Figura 10 - Liberação de LDH em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas incubados com ConA e KCl....	41
Figura 11 - Liberação de L-[³ H] glutamato induzida por KCl em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas incubados com ConBr.....	42
Figura 12 - Efeito da lectina ConBr na liberação de L-[³ H] glutamato induzida por α -latrotoxina em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas.....	44
Figura 13 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 1 minuto.....	47
Figura 14 - I Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 2 minutos.....	48
Figura 15 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 5 minutos.....	49
Figura 16 - Efeito da lectina ConA e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 1 minuto.....	51

Figura 17 - Efeito da lectina ConA e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 2 minutos.....	52
Figura 18 - Efeito da lectina ConA e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 5 minutos.....	53
Figura 19 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de JNK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 1 minuto.....	55
Figura 20 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de JNK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 2 minutos.....	56
Figura 21 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de JNK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 5 minutos.....	57
Figura 22- Efeito de ConBr (A) e ConA (B) na redução do MTT em fatias de hipocampo de ratas adultas.....	59
Figura 23 - Efeito de ConBr sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratas adultas em incubações de 5 minutos.....	62
Figura 24 - Efeito de ConBr sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratas adultas em incubações de 30 minutos.....	63
Figura 25 - Efeito da lectina ConBr na redução do MTT em células de glioma C6.....	65
Figura 26 - Efeito da lectina ConA na redução do MTT em células de glioma C6.	66
Figura 27 - - Efeito de ConBr sobre a fosforilação de ERK1/2 em células C6 no período de incubação de 24 horas.....	68
Figura 28 - Efeito de ConA sobre a fosforilação de ERK1/2 em células C6 no período de incubação de 24 horas.....	69
Figura 29 - Efeito de ConBr sobre a proliferação das células U-937 em 24 horas pelo método do MTT.	71
Figura 30 - Efeito de ConBr sobre a proliferação das células U-937 em 48 horas pelo método do MTT.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

1. Ala: alanina
2. AMPA: alfa-amino-3-hidróxi-metilsoxazolepropionato
3. AMPc: monofosfato de adenosina cíclico
4. AngII: angiotensina II
5. Asp: Aspartato
6. ATP: trifosfato de adenosina
7. BSA: albumina sérica bovina
8. CABO: lectina de *Canavalia bonariensis*
9. CaM: calmodulina
10. CFL: lectinas de *Cratylia floribunda*
11. CIRL: receptor de α -latrotoxina cálcio-independente
12. ConA: Concanavalina A
13. ConBr: lectina de *Canavalia brasiliensis*
14. DGuil: lectina de *Dioclea guianensis*
15. DMSO: dimetil sulfóxido
16. DTT: ditioneitol
17. DViol: lectina de *Dioclea violacea*
18. ECL: quimiluminescência
19. EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético
20. EGF: fator de crescimento epidermal
21. ERK: quinase regulada por sinal extracelular
22. Gly: glicina
23. GMP: monofosfato de guanosina
24. GMPc: monofosfato de guanosina cíclico
25. Grb2: proteína ligante de receptor de fator de crescimento 2
26. GDP: guanosina difosfato
27. GTP: guanosina trifosfato
28. HEPES: ácido N-2-Hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
29. JNK: quinase c-Jun NH₂-terminal
30. KCl: cloreto de potássio

- 31. LDH: lactato desidrogenase
- 32. LTD: depressão de longa duração
- 33. LTP: potenciação de longa duração
- 34. MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
- 35. MAPKK: quinase da proteína quinase ativada por mitógeno
- 36. MEK: quinase da proteína quinase regulada por sinal extracelular
- 37. MTT: brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium
- 38. NMDA: N-metil-D-aspartato
- 39. NO: óxido nítrico
- 40. p38^{MAPK}: proteína quinase ativada por mitógeno de 38 kDa
- 41. PBS: tampão fosfato-salina
- 42. PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
- 43. PKC: proteína quinase C
- 44. Raf: quinase serina/treonina de 74 kDa
- 45. Ras: proteína G de 21kDa
- 46. RBA: “Rice Bran Agglutinin”
- 47. ROS: espécies reativas de oxigênio
- 48. SDS: dodecil sulfato de sódio
- 49. SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
- 50. SFB: soro fetal bovino
- 51. SNC: sistema nervoso central
- 52. SOS: “son of sevenless”
- 53. TBS: tampão tris-salina
- 54. TBS-T: tampão tris-salina com Tween-20
- 55. TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

RESUMO

Lectinas são proteínas com especificidade de ligação à resíduos de carboidratos. ConBr e ConA são lectinas com especificidade para D-glicose/D-manose, extraídas de plantas, família Leguminosae, tribo Phaseolae, subtribo Diocleinae. Estas lectinas podem estimular a proliferação de linfócitos e produção de interferon γ , ativar macrófagos e produzir inflamação, além de induzirem apoptose em vários tipos celulares. Apesar destes efeitos, existem poucos estudos das ações destas lectinas sobre células tumorais e sobre preparações neurais, especialmente sobre os mecanismos de sinalização celular envolvidos na regulação da neurotransmissão, diferenciação, proliferação e morte celular. O presente trabalho tem como objetivos: a) determinar as possíveis ações de ConBr e ConA sobre a viabilidade e modulação da liberação do neurotransmissor glutamato no terminal sináptico (sinaptossoma); b) determinar possíveis ações destas lectinas sobre a viabilidade celular em fatias hipocâmpais, em células de linhagens tumorais de glioma C6 e mieloleucêmicas U-937; c) determinar ações dessas lectinas sobre a via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) nestas preparações. ConBr e ConA (5-100 $\mu\text{g/ml}$) foram incubadas (1-5min) com sinaptossomas ou fatias hipocâmpais obtidas de ratas adultas (60-70dias). Além disso, estas lectinas (0,5-100 $\mu\text{g/ml}$) foram incubadas por 24-48h com linhagens tumorais de glioma C6 ou mieloleucêmicas U-937. Os testes de viabilidade foram realizados através de medidas da liberação de LDH ou da redução do MTT. A liberação de ^3H -glutamato foi medida através de cintilação líquida. A modulação das vias de MAPKs foi avaliada através de Western blotting usando anticorpos contra as formas fosforiladas e totais de ERK1/2, JNK1/2 e p38^{MAPK} . Os resultados mostraram que ConA e ConBr não alteraram a viabilidade e nem a liberação basal de L-[^3H]glutamato em sinaptossomas. α -Latrotoxina 1nM sozinha aumentou

43% da liberação de L-[³H]-glutamato em relação ao controle e ConBr provocou um incremento significativo de 20% no efeito de α -latrotoxina. E em sinaptossomas, a ConBr mas não ConA estimulou ERK1/2. Estas lectinas não alteraram a viabilidade celular e nem a fosforilação de MAPKs em fatias hipocâmpais. ConA e ConBr diminuíram fortemente a viabilidade celular em linhagens de glioma C6, sendo este efeito acompanhado de redução da fosforilação de ERK1/2. Nas células mieloleucêmicas U-937, ConBr causou uma redução de viabilidade significativa. Apesar da alta homologia estrutural entre ConA e ConBr estas lectinas apresentaram variações em alguns efeitos biológicos. Os resultados descrevem de forma inédita a modulação, por ConBr, da liberação de glutamato e de MAPKs em sinaptossomas. Adicionalmente, demonstram uma ação de ConBr e ConA na morte celular e/ou inibição de proliferação celular em linhagens tumorais. Em conjunto os dados sugerem ConBr como uma possível ferramenta para estudo da transmissão sináptica e ConBr e ConA como potenciais ferramentas para estudo de processos relacionados a morte celular em células tumorais.

Apoio: CNPq, CAPES/PROCAD, International Society for Neurochemistry (ISN) e FUNCITEC

ABSTRACT

Lectins are proteins with specific binding for carbohydrate moieties of glycoconjugates. ConBr and ConA show specificity for D-glucose/D-mannose and they are extracted from the seeds of plants, Leguminosae, subtribe Diocleinae. Their biological activity includes induction of lymphocytes proliferation, interferon γ production, macrophages activation, production of inflammation and apoptosis in various cell culture models. In spite of these effects, their action on tumoral cell lines and neural preparations, specially on cell signaling mechanisms involved on neurotransmission, cell proliferation and cell death, are not well investigated. The present work aims: a) to determine the action of ConBr and ConA on synaptosomal viability and glutamate release; b) to determine the action of these lectins on cell viability in models of hippocampal slices and tumoral cell lines of glioma C6 and mieloleucemic U937; c) to determine the action of ConBr and ConA on mitogen activated protein kinases (MAPKs) pathway. ConBr and ConA (5-100 $\mu\text{g/ml}$) were incubated (1-5min) with synaptosomes or hippocampal slices from adult rats. The lectins (0.5-100 $\mu\text{g/ml}$) were also incubated for 24-48h with C6 glioma cells or U937 lines. The cell viability was analyzed by measurement of the MTT reduction or LDH activity released. L- ^3H -Glutamate release was assayed for 1-5 min and measured by liquid cintilation. The MAPK modulation was analyzed by western blotting. The results showed that ConBr and ConA did not change the synaptosomal viability or basal L- ^3H -Glutamate release. α -Latrotoxin causes 43% increase of ^3H -glutamate release relative to control and ConBr provoked a significant increment (20%) on this effect. ConBr but not ConA increased the synaptosomal ERK1/2 phosphorylation. In hippocampal slices it was not observed alteration of cell viability or MAPKs phosphorylation. Both ConBr and ConA cause a significant decrease of cell viability in glioma C6 cell lines,

measured by MTT, which was accompanied by a decrease of ERK1/2 phosphorylation. ConBr also decrease the cell viability of U937 cells. In spite of high structural homology between ConBr and ConA, differences of some biological activities were observed. The results show synaptosomal modulation of MAPK phosphorylation and glutamate release by ConBr. Additionally, suggest a possible action of ConBr and ConA causing tumoral cell death or inhibition of proliferation. Therefore, we suggest ConBr as a possible tool in synaptic transmission studies and ConA and ConBr as a potential tools to study mechanisms of tumoral cell death or proliferation.

Supported by: CNPq, CAPES/PROCAD, ISN and FUNCITEC

1-INTRODUÇÃO

1.1 - LECTINAS

Carboidratos agem como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos e podem influenciar fenômenos de diferenciação, proliferação e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas. As informações presentes na estrutura dos oligossacarídeos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células são reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997).

Lectinas representam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, de origem não imune, que apresentam propriedades em comum de se unir a carboidratos com alta especificidade (Cavada *et al.*, 2001). Elas são largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em animais, plantas e microorganismos. Nos animais e microorganismos elas podem servir para mediar o reconhecimento biológico de diversos eventos relacionados à comunicação celular, desenvolvimento, defesa, metástase tumoral, inflamação, etc (Cavada *et al.*, 2001). Apesar de sua abundância em muitas plantas, as lectinas de plantas não possuem sua verdadeira função fisiológica claramente definida. Entre algumas funções propostas para lectinas de plantas estão incluídas: armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes, inibição do crescimento de fungos (Sharon & Lis, 1989) ou atividade inseticida (Trigueros *et al.*, 2003). Entre as lectinas mais estudadas estão as lectinas de plantas, principalmente as da família Leguminosae. Lectinas dessa família representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. A subtribo Diocleinae (família Leguminosae) compreende 13 principais gêneros, sendo que algumas lectinas têm sido isoladas de plantas que pertencem a alguns destes gêneros: *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* (Cavada *et al.*, 2001).

A Concanavalina A (ConA), obtida das sementes de *Canavalia ensiformis* (Família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae), foi a primeira lectina a ser isolada, sequenciada e teve sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raio-x. ConA é uma lectina D-glicose/D-manose específica e seu monômero contém 237 resíduos de aminoácidos. Muitos estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais fizeram desta proteína a lectina de planta melhor caracterizada (Cavada *et al.*, 2001).

Esta lectina tem sido muito estudada e caracterizada quanto a sua estrutura e efeitos biológicos sobre diferentes sistemas. No sistema nervoso central (SNC) a lectina ConA têm sido utilizada como ferramenta no isolamento de glicoproteínas (Helmnolz *et al.*, 2003), no estudo de receptores glutamatérgicos, especialmente AMPA e Kainato (Partin *et al.*, 1993; Yue, *et al.*, 1995; Everts *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 1998), na determinação do papel de neurexinas e outros receptores na liberação de transmissores (Boehm & Huck, 1998) e no estudo da plasticidade no SNC (Lin & Levitan, 1991; Scherer & Udin, 1994).

A partir do isolamento de ConA, várias lectinas com propriedades físicas similares tem sido purificadas e parcialmente caracterizadas de outras espécies da subtribo Diocleinae, como as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, ConBr (Moreira & Cavada, 1984), *Canavalia bonariensis*, CABO (Cavada *et al.*, 1996), *Cratylia floribunda*, CFL (Oliveira *et al.*, 1991), *Dioclea guianensis*, DGuiL (Vasconcelos *et al.*, 1991), *Dioclea violacea*, DVioL (Moreira *et al.*, 1996), entre outras.

Várias evidências têm demonstrado que apesar de terem alta homologia, ConA e outras lectinas desta mesma subtribo apresentam importantes variações em termos de atividades biológicas (Cavada *et al.*, 2001) no que se refere a capacidade de: estimular a proliferação de linfócitos e produção de interferon- γ (Barral-Netto *et al.*, 1992), estimular macrófagos peritoneais e reações de inflamação (Rodriguez *et al.*, 1992), induzir edema de

pata em ratos e migração de células peritoneais (Bento *et al.*, 1993) e promover a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos (Gomes *et al.*, 1994).

Todas as lectinas Diocleinae apresentam estruturas multiméricas compostas de monômeros de 25,5 KDa, além de exibirem a característica de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH (Calvete *et al.*, 1999). Elas são metaloproteínas que requerem íons divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para exibir atividade biológica completa (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997). Cada subunidade também contém sítios de ligação para íons Ca^{2+} e Mn^{2+} e uma cavidade hidrofóbica que interage com ligantes hidrofóbicos, assim como fito-hormônios. Todas essas lectinas apresentam como especificidade principal de reconhecimento os carboidratos D-manose e D-glicose (Cavada *et al.*, 2001).

1.1.1 - Lectina das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

ConBr, a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*, apresenta 99% da seqüência de aminoácidos idêntica a seqüência de ConA e apresenta a mesma especificidade a glicose/manose (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997).

Apesar da similaridade estrutural, as lectinas ConA e ConBr podem apresentar diferentes efeitos biológicos relacionados a indução de edema de pata em ratos (Bento *et al.*, 1993), propagação de macrófagos peritoneais em camundongos (Rodriguez *et al.*, 1992), produção de NO (Andrade *et al.*, 1999) e estimulação de linfócitos humanos *in vitro* (Barral-Netto *et al.*, 1992). Recentemente foi descrito que a lectina ConBr também pode induzir ativação de linfócitos e apoptose (Barbosa *et al.*, 2001), bem como produção de NO (Óxido Nítrico) por macrófagos (Andrade *et al.*, 1999). Também foi relatada a indução de apoptose por ConA em macrófagos de camundongos (Suen *et al.*, 2000).

Tem sido sugerido que substituições de aminoácidos fora do sítio de união de carboidratos podem ser responsáveis pela diferença na afinidade de ligação a açúcares e atividades biológicas das lectinas Diocleinae (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997; Grangeiro *et al.*, 1997). A estrutura cristalina de ConBr é representada abaixo (Figura 1) e mostra os resíduos de aminoácidos que variam em relação a ConA. Apenas dois aminoácidos são substituídos e nenhum destes resíduos está próximo do sítio de ligação de carboidratos em ambas lectinas (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997; Grangeiro *et al.*, 1997).

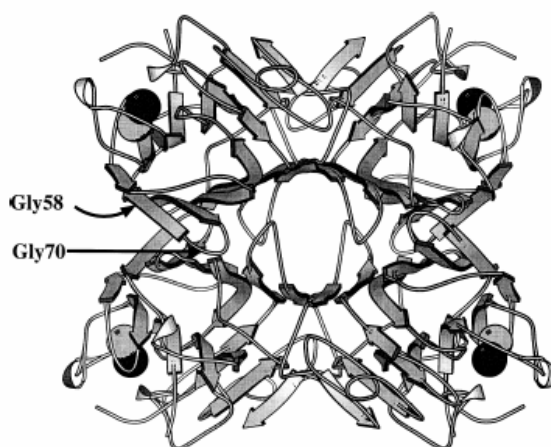


Figura 1 - Estrutura global do tetrâmero de ConBr e a localização das quatro subunidades. As posições dos resíduos de Gly 58 e Gly 70 em ConBr são substituídas por Asp e Ala em ConA, respectivamente. As esferas cinza e pretas representam os sítios de ligações dos metais de transição Mn^{2+} e Ca^{2+} , respectivamente.

(Adaptado de Sanz-Aparicio *et al.*, 1997)

Além das mudanças na estrutura primária, têm sido encontrado importantes diferenças na estrutura quaternária de ConBr em relação a ConA (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997; Grangeiro *et al.*, 1997).

A ligação das lectinas multivalentes às células resulta em ligação cruzada dos receptores de superfície celular, que está associado com uma variedade de processos de

transdução de sinal. Apenas a forma monovalente não é habilitada para causar ligação cruzada de receptores na membrana celular. A lectina ConBr apresenta um comportamento de oligomerização diferente de ConA. Por exemplo, enquanto ConA é um tetrâmero homogêneo em pH 7, ConBr exibe uma mistura de dímeros (31%) e tetrâmeros (69%) nesta mesma faixa de pH (Calvete et al, 1999).

A razão entre as espécies divalentes e tetravalentes, junto com mudanças na orientação relativa dos sítios de ligação de carboidratos nas estruturas quaternárias das lectinas homólogas, tem sido sugeridas como explicação para as diferentes atividades e potências biológicas das lectinas Diocleinae de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformes* (Calvete et al., 1999).

1.2 - TRANSMISSÃO SINÁPTICA

O sistema nervoso é um sistema altamente complexo onde bilhões de células interagem e processam informações formando uma grande rede de comunicação. Devido à alta complexidade deste sistema, muitos de seus aspectos ainda não estão esclarecidos.

A transmissão sináptica é a unidade processadora de sinais do sistema nervoso. Trata-se da estrutura microscópica de contato entre um neurônio e outro ou uma célula efetora por meio de zonas de contato especializadas denominadas sinapses (Figura 2), através da qual se dá a transmissão de mensagens (Lent, 2001). Sinapses compreendem duas unidades conectadas funcionalmente: primeiro, o compartimento pré-sináptico, onde há um grande número de proteínas constituindo a maquinaria de liberação de vesículas sinápticas; e segundo, o aparato pós-sináptico que detecta a transmissão e propaga os sinais (Leenders & Sheng, 2005).

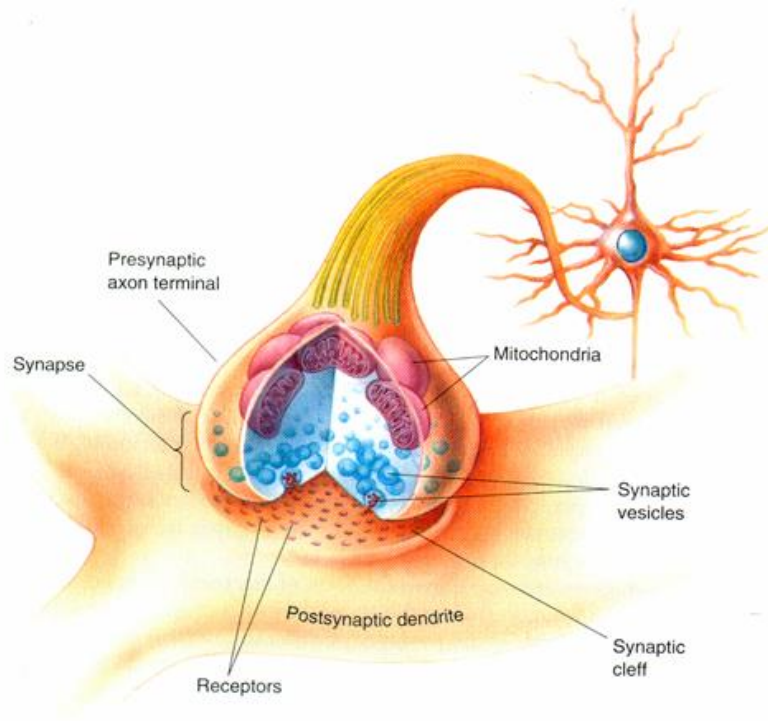


Figura 2 - Transmissão sináptica entre um neurônio e outro por meio de zonas de contato especializadas denominadas sinapses.

(Adaptado de Bear et al., 2002)

As mensagens ou sinais podem ser transmitidos através de transmissão sináptica elétrica ou transmissão sináptica química. Na sinapse elétrica os neurônios estão acoplados por junções abertas (estruturas protéicas que conectam diretamente o citoplasma de duas células), as quais permitem o livre movimento de íons ou até mesmo pequenas moléculas entre células acopladas. Na sinapse química, as células pré e pós-sinápticas estão separadas por um espaço (fenda sináptica) e uma alteração no potencial elétrico do terminal pré-sináptico induz a liberação de substâncias químicas neurotransmissoras e neuromoduladoras (Lent, 2001). A liberação de neurotransmissores envolve uma série de interações, dependente de cálcio, entre proteínas de membrana das vesículas sinápticas e proteínas de membrana do

terminal pré-sináptico, resultando na fusão completa das duas membranas e subsequente liberação do conteúdo das vesículas sinápticas na fenda sináptica (Westerink, 2004). Os neurotransmissores se difundem através da fenda sináptica e geralmente interagem com o receptor na membrana pós-sináptica, abrindo ou fechando canais de íons, ou ativando ou inibindo um sistema enzimático. O processo é finalizado com a captação ou metabolização dos neurotransmissores e/ou modificação do número ou atividade dos receptores (Lent, 2001).

Em vários estudos fisiológicos têm sido utilizados sinaptossomas como modelo experimental de terminais nervosos isolados, para investigar a liberação de neurotransmissores (Dunkley *et al.*, 1988). Sinaptossomas são preparações subcelulares do tecido nervoso, que correspondem ao terminal sináptico isolado destacado do axônio (Figura 3). A importância dessas preparações é que elas representam o sistema mais simples que retém todo o sistema de captação, síntese, armazenamento e liberação de neurotransmissores (Sánchez-Prieto *et al.*, 1996). Esses terminais nervosos apresentam várias estruturas e sistemas intactos como mitocôndria viável, produção de ATP e metabolismo energético ativo. Apresentam ainda, potencial de membrana normal, expressam carreadores de captação e canais de íons funcionais em sua membrana plasmática. Na aplicação de estímulos despolarizantes (ex.: K^+), a entrada de cálcio nos sinaptossomas via canais de cálcio voltagem-dependentes, dispara a exocitose de vesículas ancoradas. Através deste processo muitos neurotransmissores (incluindo aminoácidos, peptídeos e catecolaminas) são liberados no meio extracelular (Breukel *et al.*, 1997).

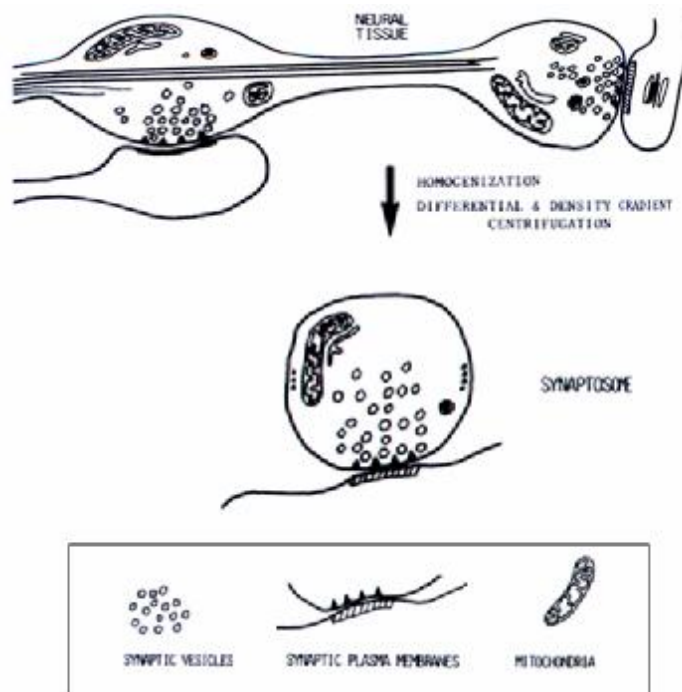


Figura 3 - Desenho esquemático da preparação de terminais sinápticos isolados (sinaptossomas).

(Adaptado de Phelan & Gordon Weeks, 1992)

1.2.1. - Transmissão glutamatérgica

Várias substâncias agem como neurotransmissores na transmissão sináptica do SNC. Entre elas está o glutamato, um aminoácido que atua como principal mediador da transmissão sináptica excitatória, incluindo a transmissão excitatória rápida e a potenciação de longa duração (LTP). Este aminoácido está presente em alta concentração no SNC. Deste modo, o glutamato está envolvido nas funções cognitivas, motoras e sensoriais e na diferenciação neuronal (Meldrum, 2000). O glutamato também participa na gênese de uma ampla variedade de lesões neurotóxicas agudas e degenerativas crônicas do SNC (McDonald & Johnston, 1990).

A existência de uma grande variedade de receptores faz com que o neurotransmissor glutamato tenha uma ampla diversidade funcional. Além de participar das funções fisiológicas, o glutamato pode causar potentes efeitos neurotóxicos. Em alterações agudas (hipóxia, isquemia, traumatismo craniano) ou crônicas (doenças neurodegenerativas), as células neurais afetadas podem liberar glutamato em grande quantidade através de processos não controlados (Meldrum, 2000; Segovia *et al.*, 2001). Deste modo, o glutamato presente em excesso na fenda sináptica aumenta o influxo de íons cálcio, ativando processos intracelulares dependentes de cálcio, os quais desencadeiam ações excitotóxicas que levam à morte das células neurais circundantes.

Os receptores glutamatérgicos são divididos em dois grupos: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são uma família de canais iônicos e denominados de acordo com seu agonista sintético mais seletivo: NMDA (N-metil-D-aspartato), o qual quando ativado permite a entrada de cálcio, AMPA (alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato) e kainato, que permeiam principalmente a entrada de sódio e potássio. Os receptores metabotrópicos, também ativados por agonistas seletivos, acoplam-se a proteínas-G e modulam efetores intracelulares, como a fosfolipase C e adenilato ciclase (Gasic & Holmann, 1994).

Muitos receptores, incluindo receptores de glutamato, não mantêm uma resposta quando expostos a uma concentração constante de agonista. Este fenômeno chamado dessensibilização é observado em sinapses durante aplicações exógenas de neurotransmissores ou agonistas (Thalhammer *et al.*, 2002).

Receptores ionotrópicos de glutamato sofrem dessensibilização em exposições prolongadas ao neurotransmissor excitatório L-glutamato, assim como a vários de seus análogos estruturais (Seeburg, 1993). Vários estudos têm sugerido que a dessensibilização dos

receptores de glutamato podem modular a magnitude e a duração das respostas pós-sinápticas excitatórias (MacBain & Mayer, 1994), desta maneira, apresentando um importante papel na limitação da excitação mediada por este neurotransmissor (Yue *et al.*, 1995).

Lectinas, proteínas com propriedades de se unir a oligossacarídeos, como ConA e outras lectinas de plantas, têm sido objetos de intensa investigação desde que Mathers e Usherwood em 1976 relataram que ConA bloqueia a dessensibilização de receptores glutamatérgicos em fibras musculares de inseto. Essa ação de ConA foi confirmada e também mais tarde relatado para neurônios de ratos (Huttner, 1990). O efeito potencializador das lectinas foi também testado em sistemas recombinantes de receptores glutamatérgicos expressos em oócitos (Yue *et al.*, 1995; Everts *et al.*, 1997). Também foi observado a modulação da união de [³H] AMPA a receptores glutamatérgicos por lectinas com especificidade a glicose/manose, assim como ConA (Hoffman *et al.*, 1998). Um outro trabalho demonstrou uma comparação dos efeitos causados por lectinas com diferentes especificidades a receptores recombinantes glutamatérgicos (Thalhammer *et al.*, 2002). A união das lectinas a grupos de carboidratos na superfície das células pode levar a uma ligação-cruzada e/ou agregação de proteínas de membranas (Lis & Sharon, 1986). Então, lectinas podem se ligar às cadeias de carboidratos presentes nas subunidades dos receptores bloqueando a dessensibilização por ligação-cruzada e/ou estabilizando a configuração aberta do receptor de glutamato (Yue *et al.*, 1995).

1.2.2. -Toxinas na liberação de neurotransmissores

Toxinas animais e vegetais têm sido freqüentemente utilizadas no estudo do SNC. Elas têm mostrado ser ferramentas extremamente úteis na compreensão dos mecanismos

moleculares envolvidos na fisiologia e patologia do SNC (Gutman & Lazarovici, 1997; Lineal *et al.*, 1998).

Uma grande variedade de toxinas afeta a liberação de neurotransmissores, interagindo diretamente com o sistema de exocitose ou com algumas das etapas anteriores que desencadeiam este evento (Adams & Swanson, 1996).

Um exemplo dessas toxinas é a α -latrotoxina, uma neurotoxina derivada do veneno da aranha viúva-negra, que se liga com alta afinidade a determinados receptores nos terminais nervosos em vertebrados, causando uma estimulação massiva da liberação de neurotransmissores por exocitose (Khvotchev & Südhof, 2000). Duas classes de receptores de α -latrotoxina têm sido identificadas. A primeira tem sido identificada como neurexina-Ia, um membro da grande família de neurexinas, que são glicoproteínas de superfície celular, específicas e enriquecidas no tecido nervoso, possui alta afinidade de ligação à α -latrotoxina de maneira dependente de Ca^{+} (Ushkaryov *et al.*, 1992). A segunda classe de receptores, latrofilina, também chamada de CIRL (“Cálcium-Independent Receptor of α -Latrotoxin”), que pertence a uma família de receptores acoplados a proteína-G (Krasnoperov *et al.*, 1997) não são específicas do cérebro, mas são largamente expressas em todos os tecidos (Sugita *et al.*, 1998). Essa família de receptores liga-se a α -latrotoxina de maneira independente de Ca^{+} (Krasnoperov *et al.*, 1997). Ambas, neurexina-Ia e latrofilina são glicoproteínas e podem interagir com lectinas (Boehm & Huck, 1998).

A lectina ConA tem sido frequentemente utilizada no estudo de vários aspectos da função neuronal, incluindo plasticidade neuronal (Lin & Levitan, 1991). Apesar dos diferentes efeitos exercidos por ConA nos sítios pós-sinápticos, apenas um efeito proeminente desta lectina tem sido descrito em especializações pré-sinápticas: ConA inibe a liberação de transmissores evocada por α -latrotoxina (Grasso *et al.*, 1978, Meldolesi, 1982), sendo que o

efeito inibitório da lectina ConA sobre a liberação de neurotransmissores evocada por α -latrotoxina envolve a união da lectina aos receptores glicoprotéicos desta toxina (Boehm & Huck, 1998).

1.3 - SINALIZAÇÃO CELULAR

A sinalização celular é um evento onde um ligante externo (por exemplo, um neurotransmissor) é capaz de produzir uma resposta específica da célula. As células respondem a sinais extracelulares através de mecanismos como, transdução de sinais iniciados pela interação de ligantes extracelulares (hormônios, citocinas, neurotransmissores, fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização) com receptores específicos ancorados principalmente na membrana plasmática, ou também no citoplasma ou no núcleo. Os sinais são transduzidos da superfície celular para o interior da célula através da interação proteína-proteína ou pela geração de segundos mensageiros como o cálcio, diacilglicerol, inositol 1,4,5-trifosfato, AMP cíclico e GMP cíclico, que levam à ativação de proteínas quinases específicas. O resultado final da ativação de uma via de sinalização é a fosforilação de proteínas alvo específicas, modulando a sua atividade e a atividade da própria célula (Holz & Fisher, 1999).

A fosforilação de proteínas é um mecanismo fundamental na regulação das diversas funções celulares em resposta aos sinais extracelulares via receptores (Greengard, 2001; Leal *et al.*, 1997; Leal *et al.*, 2002a). Um sistema de fosforilação consiste de uma proteína quinase, uma proteína fosfatase e uma proteína aceptora de fosfato (proteína substrato). A proteína substrato é convertida da forma defosforilada para a forma fosforilada pela proteína quinase, e o retorno para a forma defosforilada é realizado pela proteína fosfatase.

As proteínas quinases catalisam a transferência de um grupo fosfato (γ) do ATP para um resíduo de serina, treonina ou tirosina da proteína substrato. As proteínas fosfatases catalisam a clivagem dessa ligação por hidrólise. A fosforilação de uma proteína altera sua carga e por consequência sua conformação. Esse mecanismo regula a atividade funcional de diversas proteínas levando as respostas biológicas específicas (Greengard, 2001).

Entre as principais quinases do cérebro estão aquelas ativadas por: AMPc (proteína quinase A), GMPc (proteína quinase G), cálcio/calmodulina (proteínas quinases Ca^{2+} -calmodulina dependente) e por cálcio-diacilglicerol (proteína quinase C) (Hunter & Sefton, 1991; Nestler & Greengard, 1999). Adicionalmente, é bem documentada no SNC a cascata de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) (Sweatt, 2001; Sweatt, 2004).

1.3.1. Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK)

Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) representam uma família de serina-treonina quinases que medeiam a transdução de sinal intracelular em resposta a diversos estímulos. As MAPKs regulam diversas atividades, incluindo embriogênese, diferenciação, proliferação (Chang & Karin, 2001) e transformação celular (Neill & Kolch, 2004), respostas de estresse (Cowan & Storey, 2003), alteração morfológica e apoptose (Park *et al.*, 2000), entre outras.

A ativação das MAPKs é dependente de outras quinases colocadas anteriormente a elas na via de sinalização, sendo chamadas quinases das MAPKs (MAPKK) (Chen *et al.*, 2001). Desta forma, a fosforilação reversível das MAPKs sobre um resíduo de treonina e um resíduo de tirosina, conduz sua ativação (Chen *et al.*, 2001; Chang & Karin, 2001). Três

MAPKs principais têm sido caracterizadas: proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2); Jun amino-terminal kinase (JNK); e p38^{MAPK}. JNK e p38^{MAPK} são ativadas por diversos estímulos ambientais de estresse (Cowan & Storey, 2003) e citocinas (Mielk & Herdegen, 2000), enquanto ERK1/2 estão geralmente envolvidas na resposta a fatores de crescimento (ex. PDGF, EGF), mediando proliferação e diferenciação celular (Chen *et al.*, 2001; Wang & Bonner, 2000), entre outras respostas.

A via da ERK1/2 apresenta-se como uma cascata de serina-treonina quinase que além de ser conhecida por apresentar um importante papel no crescimento e diferenciação celular, tem sido relatada sua participação em eventos de plasticidade sináptica, como aprendizado e memória (Sweatt, 2004; Thomas & Huganir, 2004) e ainda como modulador de respostas sinápticas em curto prazo, assim como na liberação de neurotransmissores (Orban *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2002).

A ativação da via clássica de ERK se dá pela união de um ligante ao receptor tirosina quinase. Isto leva à ativação de vários módulos de sinalização incluindo a cascata das proteínas quinases onde Ras, Raf, MEK e ERK são ativadas consecutivamente (Figura 4), participando de vários eventos incluindo crescimento e diferenciação celular (Greengard, 2001). A ativação de um receptor acoplado a proteína G e o aumento da concentração intracelular de cálcio $[Ca^{2+}]_i$ em resposta a despolarização ou a estimulação do receptor de glutamato podem também induzir ativação de ERK por mecanismos que ainda estão sendo esclarecidos (Pereira *et al.*, 2002). Uma das possibilidades da ativação de MAPKs é a ligação de Ca^{2+} /Calmodulina (CaM) ao receptor de cálcio voltagem-dependente do tipo L. CaM pode se apresentar como sensor na entrada do canal de cálcio ativando a via das MAPK através de proteínas quinases Ca^{2+} /CaM dependentes, e levando a estimulação de genes que são essenciais a sobrevivência e plasticidade neuronal (Dolmetsch *et al.*, 2001).

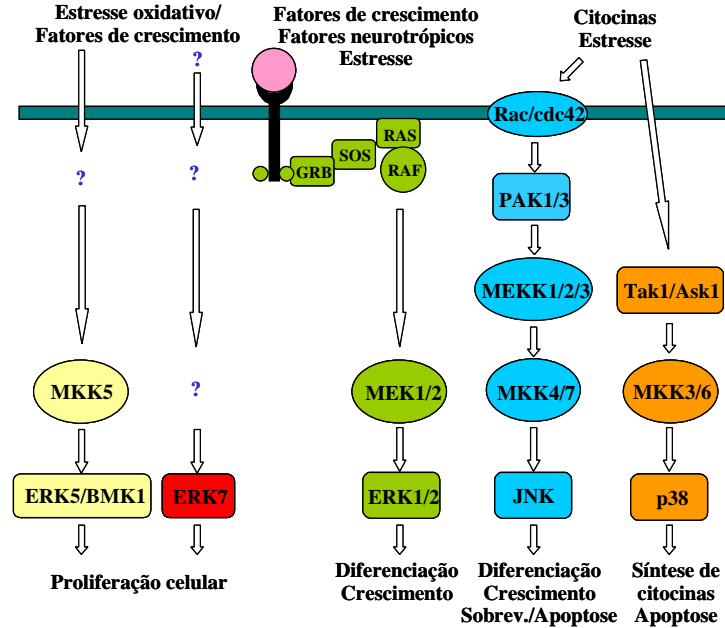


Figura 4 - Cascata de sinalização de MAPK

JNK e $p38^{\text{MAPK}}$ são ativadas por insultos citotóxicos e estão associadas frequentemente com apoptose (Park *et al.*, 2000; Enomoto *et al.*, 2003). As JNKs são largamente distribuídas nos tecidos dos mamíferos, incluindo o cérebro. Um possível papel fisiológico das JNKs é o envolvimento na regeneração neuronal e neuroplasticidade (Bevilaqua *et al.*, 2003). Embora, vários estudos possam sugerir possíveis papéis fisiológicos para as JNKs, é bem caracterizada a participação dessas quinases como mediadores de morte celular neuronal e degeneração na excitotoxicidade, isquemia, lesões de fibras nervosa e retirada de fatores tróficos (Mielke & Herdegen, 2000; Mizukami *et al.*, 2001).

Assim como as JNKs, as $p38^{\text{MAPK}}$ são largamente expressas em muitos tecidos, além do SNC. Os membros da família das proteínas quinases $p38^{\text{MAPK}}$ estão envolvidos na regulação de diversas funções celulares desde o controle da morte celular até a proliferação e diferenciação celular (Martin-Blanco, 2000; Tadlock & Patel, 2001). Estudos sugerem que

essa enzima possui também um importante papel na regulação da resposta imune (Takenaka *et al.*, 1998). Alguns trabalhos têm sugerido funções neuroprotetoras exercidas pela p38^{MAPK} (Uehara *et al.*, 1999; Hensley *et al.*, 2000). Adicionalmente, Mielke & Herdegen (2000) sugerem que a estabilização da diferenciação pós-mitótica dos neurônios é um provável papel fisiológico da p38^{MAPK}. Entretanto, é bem caracterizado o envolvimento dessa enzima em condições de estresse e morte celular (Wan Ko *et al.*, 2000; Mielke & Herdegen, 2000), isquemia (Irving *et al.*, 2000), estresse oxidativo (Lee *et al.*, 2000) e excitotoxicidade (Kawasaki *et al.*, 1997).

Diversos receptores celulares e proteínas de matriz extracelular que modulam, direta ou indiretamente, as vias de sinalização dependentes de MAPKs são de natureza glicoprotéica, podendo portanto, ser alvo de ligações de lectinas (Tang *et al.*, 2000; Partin *et al.*, 1993; Yue, *et al.*, 1995; Everts *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 1998). Tem sido demonstrado que a lectina ConA induz a proteólise do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF), bloqueando portanto, a ativação de ERK induzida por Angiotensina II (Ang II) em células de músculo liso vascular (Tang *et al.*, 2000). Entre outros efeitos da lectina ConA sobre MAPK estão: o estímulo de JNK-1, através da modulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em timócitos (Pani *et al.*, 2000), estímulo de tirosina quinases e de ERK1/2 em neutrófilos (Ohta *et al.*, 1992) e produção de ROS em neutrófilos, que também pode modular a via de MAPKs, especialmente JNK e p38^{MAPK} (Liang *et al.*, 1990). Apesar destes relatos, existem poucos trabalhos na literatura que caracterizem a modulação das vias de MAPKs por lectinas.

1.4 - LECTINAS E CÉLULAS TUMORAIS

Entre algumas atividades biológicas das lectinas estão incluídas, aglutinação celular, mitose, toxicidade e inibição do crescimento celular. Algumas lectinas têm mostrado induzir apoptose em vários tipos de células, o qual pode ajudar a explicar sua toxicidade (Hasegawa *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000).

Os mecanismos pelos quais as lectinas podem induzir apoptose não estão bem esclarecidos, porém a internalização de algumas lectinas é considerada evento crucial para que ocorra a indução de apoptose (Koyama *et al.*, 2002).

A apoptose induzida pela lectina ConA em fibroblastos gengivais está associada a redução do potencial de membrana mitocondrial, diminuição da homeostase de cálcio intracelular e variações nos níveis de Bcl-2 (Kulkarni *et al.*, 1998). Depois de se ligar a superfície celular, ConA é internalizada, e é translocada a organelas subcelulares, como retículo endoplasmático, mitocôndria, complexo de Golgi, e membrana nuclear (Sharon & Lis, 1989). Linhagens de macrófagos de camundongos PU5-1.8 também apresentam morte apoptótica induzida por ConA por intermédio do agrupamento de mitocôndrias e liberação de citocromo c (Suen *et al.*, 2000). Foi demonstrado que outras lectinas da subtribo Diocleinae como ConBr, DGL e Dviol, além de estimular a ativação de linfócitos *in vivo*, induziram apoptose na mesma região dos linfonodos estimulados (Barbosa *et al.*, 2001).

Várias substâncias utilizadas no tratamento de câncer são conhecidas por induzir apoptose em células tumorais (Gunji *et al.*, 1991). Lectinas da planta *Viscum album* têm sido utilizadas terapeuticamente como substância ativa contra células cancerígenas, tendo efeitos potentes sobre a proliferação celular, diferenciação e apoptose (Kim *et al.*, 2001). Foi demonstrado que a lectina II de *Viscum album* induz apoptose em células mieloleucêmicas

humanas U-937 (Park *et al.*, 2000). Adicionalmente, o mesmo grupo demonstrou que esta apoptose está diretamente relacionada com ativação da cascata de caspases, ativação de JNK e clivagem da proteína quinase C (PKC) (Park *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2000). Recentemente, um outro trabalho demonstrou que a lectina II desta planta apresentou potentes efeitos na indução de substâncias pró-oxidantes intracelulares em células U-937, promovendo um aumento na geração de H₂O₂ intracelular e consequentemente podendo levar a produção de estresse oxidativo e morte celular apoptótica (Kim *et al.*, 2003).

Outras lectinas também têm demonstrado efeitos apoptóticos, entre elas estão algumas lectinas de cogumelos que também demonstraram atividade apoptótica em células de leucemia monoblástica humana U-937 (Koyama *et al.*, 2002). Algumas lectinas de plantas como RBA (“Rice Bran Agglutinin”), além das células U-937, também induziram apoptose em células de câncer de estômago MKN-45 (Miyoshi *et al.*, 2001).

1.5 - JUSTIFICATIVA

Considerando a importância dos carboidratos em influenciar diversos fenômenos fisiológicos e patológicos nas células, é possível entender que proteínas que se ligam a resíduos de carboidratos se tornam importantes para o desenvolvimento e modulação de eventos como, comunicação, diferenciação e proliferação e celular. Lectinas apresentam propriedades em comum de se unir a carboidratos com alta especificidade (Cavada *et al.*, 2001) e têm sido frequentemente utilizadas no estudo de diferentes sistemas biológicos, incluindo no sistema nervoso central (SNC) (Helmholz *et al.*, 2003). Vários aspectos da função neuronal, incluindo plasticidade neuronal (Lin & Levitan, 1991) têm sido

demonstrados, porém, poucos trabalhos têm avaliado o papel de lectinas na liberação de neurotransmissores (Boehm & Huck, 1998; Grasso *et al.*, 1978).

MAPKs regulam diversas atividades, incluindo, diferenciação, proliferação (Chang & Karin, 2001) e transformação celular (Neill & Kolch, 2004), respostas de estresse (Cowan & Storey, 2003), alteração morfológica e apoptose (Park *et al.*, 2000). Diversos receptores celulares e proteínas de matriz extracelular que modulam, direta ou indiretamente, as vias de sinalização dependentes de MAPKs são de natureza glicoprotéica, podendo portanto, ser alvo de ligações de lectinas (Tang *et al.*, 2000; Partin *et al.*, 1993; Yue, *et al.*, 1995; Everts *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 1998). Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura que caracterizem a modulação das vias de MAPKs por lectinas.

Entre algumas atividades biológicas das lectinas estão incluídas, aglutinação celular, mitose, toxicidade, inibição do crescimento e morte celular. Algumas lectinas têm mostrado induzir apoptose em vários tipos de células, o qual pode ajudar a explicar sua toxicidade (Kim *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000). Entretanto, os mecanismos pelos quais as lectinas podem induzir apoptose não estão bem esclarecidos. Várias substâncias utilizadas no tratamento de câncer são conhecidas por induzir apoptose em células tumorais (Gunji *et al.*, 1991).

Tendo em vista as diversas ações biológicas de lectinas vegetais sobre células de mamíferos, parece promissor e importante a caracterização dos efeitos biológicos de lectinas brasileiras da mesma família ou similares a ConA, sobre preparações do sistema nervoso central (SNC), incluindo liberação de neurotransmissores e sobre células de linhagens tumorais, caracterizando os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas ou efeitos biológicos observados.

2 - OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Caracterizar e comparar ações das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e de *Canavalia ensiformes* (ConA), sobre a viabilidade celular, sobre a modulação da liberação de neurotransmissores e de vias de sinalização, em preparações do sistema nervoso central (SNC) bem como em células tumorais.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

– Determinar os efeitos das lectinas ConBr e ConA *in vitro* na liberação de L-[³H] glutamato em sinaptossomas de ratas adultas

- Avaliar a viabilidade dos sinaptossomas na presença de ConA e ConBr;
- Avaliar ações das lectinas sobre a liberação basal de L-[³H] glutamato em sinaptossomas;
- Avaliar possíveis ações de ConBr sobre a liberação de L-[³H] glutamato estimulada por KCl e α -latrotoxina;
- Determinar a fosforilação de MAPKs por ConBr e ConA em sinaptossomas.

– Determinar os efeitos das lectinas ConBr e ConA *in vitro* em fatias hipocâmpais de ratas adultas

- Analisar a viabilidade de fatias hipocâmpais expostas às lectinas ConA e ConBr;
- Determinar possíveis alterações da fosforilação de ERK1/2 por ConBr.

- Determinar efeitos das lectinas ConBr e ConA *in vitro* em linhagens tumorais de glioma C6 e mieloleucêmicas U-937

- Analisar a viabilidade celular e fosforilação de MAPKs (ERKs) em células de glioma C6 tratadas com ConBr e ConA;
- Analisar a viabilidade de células U-937 tratadas com a lectina ConBr.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS

Nos modelos experimentais foram utilizadas ratas adultas da linhagem Wistar com idade entre 60 e 70 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais receberam água e comida *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura entre 22 e 25°C, sendo manipulados e mortos de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolos aprovados pela CEUA (número 062/CEUA-23080.001057/2001-78 e 297/CEUA-23080.012517/2004-36). Todos os animais foram mortos por decapitação com uma guilhotina e os cérebros rapidamente removidos.

3.2 - MATERIAS

Triton X-100, L-[³H] glutamato (atividade específica 49 Ci/mmol), Percoll, β-mercaptoetanol, Ácido Bórico, DTT, kit ECL, Glicina, Nitrocelulose, SDS, TEMED, Tris e anticorpos secundários (anti-IgG de coelho e camundongo) conjugados à peroxidase foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech[®]. “Kit” de dosagem de lactato desidrogenase (LDH) obtido da Doles Laboratório Ltda[®]. Líquido de Cintilação foi adquirido da Perkin Elmer[®]. Cloreto de Cálcio, Cloreto de Potássio, Hidróxido de Sódio, Sulfato de Magnésio foram obtidos da MERCK[®]. FOLIN, Glicose e MTT foram obtidos da SIGMA[®]. Ácido Acético, Metanol, EDTA e Sacarose foram obtidos da Nuclear[®]. Cloreto de Sódio e Glicerol foram obtidos da Vetec[®]. Os anticorpos anti-pERK, anti-pP38^{MAPK} e anti-pJNK foram obtidos da

CELL SIGNALLING[®]. Padrão de Peso Molecular foi obtido da BIO-RAD[®]. Acrilamida, Bis-acrilamida, Bromofenol Blue, HEPES, Soro Albumina Bovina, Ponceau, Coomassie Blue R-250, Persulfato de Amônia, e Tween 20 foram obtidos da USB[®]. As soluções Fixadora e Reveladora foram obtidas da KODAK[®]. Papel Filtro 3MM foi obtido da Whatman[®]. α -Latrotoxina foi gentilmente fornecida pelo Dr. Nelson Horácio Gabilan. As lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e de *Canavalia ensiformes* (ConA) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Benildo Sousa Cavada, sendo obtidas conforme descrito por Moreira & Cavada, (1984).

3.3 - EQUIPAMENTOS

Agitador Orbital BIOMIXER[®] modelo MOS-1; Sistema de Eletroforese em Mini-Gel Amersham Pharmacia Biotech[®]; Balança Analítica SCIENTECH[®] modelo SA 120; Banho Maria FANEM[®] modelo 102; Centrífuga Refrigerada HITACHI[®] modelo Himac CR20B2; Centrífuga Refrigerada Eppendorf[®] modelo 5804R; Cintilador líquido Packard[®] modelo Tri-Carb 1600 TR; Cuba de Eletrotransferência HOEFER[®] modelo TE 22; Espectrofotômetro MICRONAL[®] modelo B 382; Fatiador de tecidos de McILWAIN[®]; Fonte para Eletroforese Amersham Pharmacia Biotech[®] modelo EPS 301; Leitor de Elisa WHITTAKER[®] modelo 2001, Câmara de Neubauer Hirschmann Techcolor[®]; Estufa úmida de CO² Nuaire[®]; Fluxo laminar Veco[®]; Microscópio óptico Olympus[®].

3.4 - PREPARAÇÃO DE FRAÇÃO SINAPTOSSOMAL

Os sinaptossomas foram obtidos de acordo com o método descrito originalmente por Dunkley et al. (1988) com modificações (Migues et al., 1999). O córtex cerebral foi dissecado e homogeneizado em 10 volumes de solução de sacarose (0,32 M), EDTA (1 mM) e DTT (25mM), pH 7,4, utilizando homogenizadores de vidro. O homogenato foi centrifugado a 1.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado sobre gradientes descontínuos de Percoll (3, 7, 15 e 23%) e centrifugado a 30.000 xg por 13 minutos a 4°C. As frações sinaptossomais obtidas nas interfaces 7%-15% e 15%-23% foram coletadas, unidas e lavadas duas vezes por centrifugação a 30.000 xg por 18 minutos a 4°C com 4 ml de tampão HEPES-salina (Hepes 28 mM; KCl 2,5 mM; NaCl 133,5 mM; CaCl₂ 1 mM; K₂HPO₄ 20 mM; Glicose 12 mM). O precipitado obtido nas lavagens foi mantido sob refrigeração.

3.5 - ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE L-[³H] GLUTAMATO

O ensaio de liberação de glutamato foi adaptado a partir de Migues et al. (1999). O precipitado sinaptossomal obtido acima foi ressuspensão em 1.620 µl de tampão HEPES-salina, numa concentração protéica final de 5 mg/ml.

Nesta preparação sinaptossomal foram adicionados 180 µl de solução de L-[³H] glutamato/ L-glutamato não radioativo diluído no mesmo tampão Hepes-salina de forma a obter a concentração de glutamato final de 500nM, com atividade específica de 2 µCi/mmol.

A preparação foi incubada por 15 minutos a 37°C. Após a incubação, foram feitas três lavagens com tampão HEPES-salina para que o glutamato extra-sinaptossomal fosse retirado. Após este procedimento, alíquotas de 70µl de sinaptossomas (350 µg de proteína) foram

colocados em microtubos contendo tampão e tratamento para realização do ensaio de liberação de glutamato. Sinaptossomas foram incubados com tampão Hepes-salina como medida de controle do experimento. A seguir, o efluxo foi imediatamente interrompido por centrifugação de 1 min (16.000 g - 4°C). A contagem da radioatividade (cpm) contida nos sobrenadantes e precipitados foi realizada num cintilador líquido. A quantidade de L-[³H] glutamato liberado (sobrenadante) foi calculada como percentual da radioatividade total (sobrenadante + precipitado).

3.6 - VIABILIDADE DAS FRAÇÕES SINAPTOSSOMAS

Foi realizado o ensaio de dosagem de lactato desidrogenase (LDH) para avaliar a integridade dos sinaptossomas, pois LDH é uma enzima citosólica e a avaliação de sua atividade no meio extracelular é um indicativo de permeabilidade da membrana plasmática (Lazarovici & Lelkes, 1992). Os sinaptossomas foram incubados com as lectinas ConBr ou ConA em diferentes concentrações (5, 10 e 100 µg/ml) e diferentes tempos (1, 2 e 5 minutos) a 37°C. Após as incubações, os sinaptossomas foram centrifugados a 10.000 xg por 1 minuto. A dosagem de LDH liberado foi quantificada no sobrenadante (20 µl) utilizando as instruções descritas no “kit” de determinação de LDH (Doles[®]). A LDH intracelular foi determinada pela adição de 10% de Triton X-100 e ruptura mecânica da preparação. A atividade da LDH no meio extracelular foi expressa como percentual da atividade total (LDH sobrenadante somada a LDH intracelular).

3.7 PREPARAÇÃO DE FATIAS HIPOCAMPAS

A preparação de fatias hipocampais foi realizada conforme descrito por Leal *et al.*, (1997). Os cérebros foram retirados a 4°C sobre uma placa de Petri invertida, recoberta com papel filtro umedecido com tampão HEPES-salina (124mM de NaCl, 4mM de KCl, 1,2mM de MgSO₄, 25mM de HEPES, 12mM de glicose e 1mM de CaCl₂, pH 7.4) previamente oxigenado por 30 minutos. Os hipocampos foram dissecados com o auxílio de pincéis finos e macios e fatiados na espessura de 400µm, utilizando um fatiador de tecidos de McIlwain. Após este procedimento, os hipocampos foram mantidos submersos em tampão HEPES-salina refrigerado dentro de um recipiente de fundo escuro. Isto permitia uma melhor visualização da estrutura, facilitando a realização da separação das fatias com pincéis. As fatias selecionadas foram então submetidas aos diversos tratamentos. Cada animal (2 hipocampos) fornecia aproximadamente 12 fatias adequadas para os experimentos.

Para permitir a recuperação metabólica do tecido, as fatias de hipocampo, previamente selecionadas, foram pré-incubadas em 200µl de meio Hepes-salina por 30 minutos em temperatura ambiente, em placas de poliestireno de 96 poços (para avaliação da viabilidade celular) ou em microtubos (para avaliação por “Western Blotting”). Após esse período, o meio foi retirado e as fatias submetidas a incubações por períodos de 5 minutos ou 30 minutos a 37°C, com meio de incubação (tampão HEPES-salina) contendo ConBr ou ConA em concentrações de 5, 10 e 100µg/ml. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão Hepes-salina.

3.8 VIABILIDADE DAS FATIAS HIPOCAMPAIS

Após os respectivos tratamentos descritos anteriormente, as fatias hipocâmpais foram incubadas com MTT (0,5 mg/ml em tampão HEPES-salina) por 30 minutos a 37°C. O MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium) é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Liu *et al.*, 1997). O formazam é solubilizado com a adição de dimetil sulfóxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade óptica é medida em Leitor de ELISA ($\lambda=550$ nm). A atividade mitocondrial (viabilidade celular) é diretamente proporcional à capacidade redutora sobre o MTT e, portanto, produção de cromógeno.

3.9 - CULTURA DE CÉLULAS

As linhagens celulares de glioma C6 de rato e linfoma humano U-937 foram obtidas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Rio de Janeiro, RJ).

3.9.1 Linhagem de glioma C6

A linhagem de glioma C6 foi crescida em garrafas de cultura de 25cm², na presença de meio de cultura Dulbecco com modificações (DMEM, Sigma, Saint Louis, USA) acrescido de penicilina (0,5U/ml), estreptomicina (0,5 mg/ml) e suplementado de 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, New York, USA). As células foram manipuladas esterilmente sob fluxo laminar e estocadas em atmosfera com 95% de umidade, 5% CO² e 37°C. Após a confluência, as células foram tripsinizadas (tripsina a 0,125%, ácido tetracético etileno diamino [EDTA])

em tampão fosfato salina [PBS] pH 7,4; Gibco BRL) à temperatura ambiente, durante 1 min. A reação foi paralisada pela adição de meio de cultura contendo 5% de SFB. Após 3 lavagens em PBS, as células foram semeadas a uma densidade de 10^6 células/garrafa 25cm^2 em meio de cultura Dulbecco com modificações (DMEM, Sigma, Saint Louis, USA).

3.9.2 Linhagem linfoma humano U-937

Esta linhagem foi originalmente obtida a partir da efusão pleural de um paciente (homem caucasiano de 37 anos) com linfoma histiocítico (Sundstrom & Nilsson, 1976). A linhagem U-937 foi mantida em ambiente estéril, plaqueada a uma densidade de 10^5 células por garrafa de cultura de 25cm^2 e cultivada em 5mL de meio de cultura Iscove modificado por Dulbecco (IMDM) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) por um período aproximado de 48 horas. As células foram manipuladas em capela de fluxo laminar e mantidas em estufa com 95% de umidade, 5% CO_2 a 37°C . Após as 48 horas em cultura as células foram retiradas das garrafas, lavadas com PBS e contadas em câmara de Neubauer. Cem mil (10^5) células foram replaqueadas em garrafas de cultura e as demais células obtidas foram destinadas à experimentação.

3.10 VIABILIDADE CELULAR

Células C6 e células U-937 foram semeadas a uma densidade de 5×10^3 células/poço em placa de cultura de 96 poços. As células C6 foram incubadas durante 24, 48 e 72 horas, nas condições de cultivo com 1% de soro fetal bovino (SFB), em diferentes concentrações de ConBr e ConA (1, 10 e $100 \mu\text{g/ml}$). As células U-937 foram incubadas durante 24 e 48 horas,

em diferentes concentrações de ConBr (0,5, 1, 5, 10, 30, 50 e 100 µg/ml) em meio de cultura, na ausência ou presença de 5% de soro fetal bovino (SFB). A seguir, foram adicionados 10µl/poço de 2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT, 5mg/ml) que seguiu-se por um período de incubação de 2 horas nas condições de cultivo. As células viáveis reduziram o MTT, produzindo um precipitado colorido que foi eluído pela adição de 100µl/poço de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% acrescido de 0,04N de ácido clorídrico (HCl, Reagen), durante 12 horas, a 37°C. O ensaio foi quantificado por absorbância a 540nm em leitor de ELISA.

3.11 SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS

As fatias hipocampais e as frações sinaptossomais submetidas aos diversos tratamentos, contendo em média 200 µg de proteína total, foram solubilizadas em 100 µl de tampão de amostra (4% de SDS, 50mM de Tris, 100mM de EDTA, pH 6.8). As células de glioma C6 correspondentes a dois poços de placa de 24 poços para cada tratamento, foram solubilizadas com 140 µl, sendo obtido aproximadamente 2 µg/µl de proteína total. Todas as preparações citadas foram mantidas a 90°C por 3 minutos para permitir a solubilização dos tecidos. A seguir eram retiradas alíquotas de 3 µl para posterior dosagem de proteínas. Em cada amostra de sinaptossomas, fatia hipocampal ou células C6 era adicionado 8% de β-mercaptoetanol (v/v). Após este procedimento, era adicionada a solução de diluição de amostra (40% de glicerol, 25mM de Tris e Bromofenol Blue; pH 6.8) numa proporção solução de diluição/solução de amostra de 25:100 (v/v).

Para preparo dos géis foi utilizado um sistema de eletroforese em mini-gel Amersham Pharmacia Biotech[®], utilizando espessadores de 1 mm de espessura. As proteínas (70µg/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE),

usando mistura de gel de separação 10% (10% de Acrilamida/Bis-acrilamida 37,5:1 (w/w), 375mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,06% de TEMED e 0,036% de persulfato de amônia; pH8.8). Após o preenchimento da placa o gel permanecia em repouso durante 1 hora para plena polimerização. Logo a seguir, era adicionado o gel de entrada 4% (4% de Acrilamida/Bis-acrilamida 37,5:1 w/w, 125mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,05% de TEMED e 0,1% de persulfato de amônia; pH 6.8) e sobre este um pente de 10 dentes (Leal *et al.*, 2002b; Cordova *et al*, 2004). Após 2 horas eram aplicadas as amostras para separação. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 20mA por placa e voltagem máxima de 140 V durante aproximadamente duas horas de corrida, em temperatura ambiente, utilizando-se os tampões superior (190mM de glicina, 25mM de Tris e 0,1% de SDS) e inferior (50mM de Tris; pH 8.3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

3.12 ELETROTRANSFERÊNCIA E IMUNODETECÇÃO

Após a eletroforese o gel foi fixado durante 1 hora em solução fixadora (50% de metanol e 8% de ácido acético) e a seguir era lavado com tampão superior de eletroforese (25mM de Tris, 190mM de glicina e 0,1% de SDS) por 40 minutos. Após esse período, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (50mM de Ácido Bórico e 4mM de EDTA; pH 8.9) durante três lavagens de 10 minutos. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose no sentido do pólo negativo para o positivo, utilizando um “sanduíche” compreendido de espuma de suporte, papel filtro Whatman[®] 3MM, gel, nitrocelulose, novamente papel filtro e espuma de suporte. A transferência foi realizada a 4°C usando corrente de 400mA por 3 horas em uma cuba contendo tampão de transferência. Após

a eletrotransferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau (0,5% de Ponceau e 1% de ácido acético) para controle da transferência.

Após a eletrotransferência, as membranas foram lavadas com TBS (10mM de Tris, 150mM de NaCl, pH 7.5), para retirar o Ponceau, e a seguir foram bloqueadas por 1 hora com 5% de leite desnatado em TBS em temperatura ambiente. Após esse primeiro bloqueio, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05%, 10mM de Tris, 150mM de NaCl, pH7.5) e submetidas a um segundo bloqueio de 1 hora usando uma solução de 2,5% de gelatina sem sabor) em TBS (Baldo, 1994; Collins & Sim, 1998; Bobrovskaya *et al.*, 2001). As membranas foram novamente lavadas 3 vezes (5 minutos cada) com TBS-T, para finalmente serem incubadas com os anticorpos primários: anti-p-ERK1/2 (1:1.000), anti-pP38^{MAPK} (1:1.000) e anti-pJNK (1:1.000) “overnight” a 4°C e anti-ERK1/2 total (1:40.000) e anti-JNK total (1:10.000) por um período de 2 horas a temperatura ambiente. Após as incubações, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T (3 vezes de 5 minutos) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos (ligados à peroxidase). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas 3 vezes (5 minutos) com TBS-T e 2 vezes com TBS, sendo que as bandas correspondentes às respectivas proteínas foram reveladas através de kit ECL (quimiluminescência) (Cordova *et al*, 2004), conforme esquema mostrado na figura 5. As medidas de fosforilação e/ou imunoconteúdo das proteínas foram realizadas através de densitometria das bandas usando o programa Scion Image®.

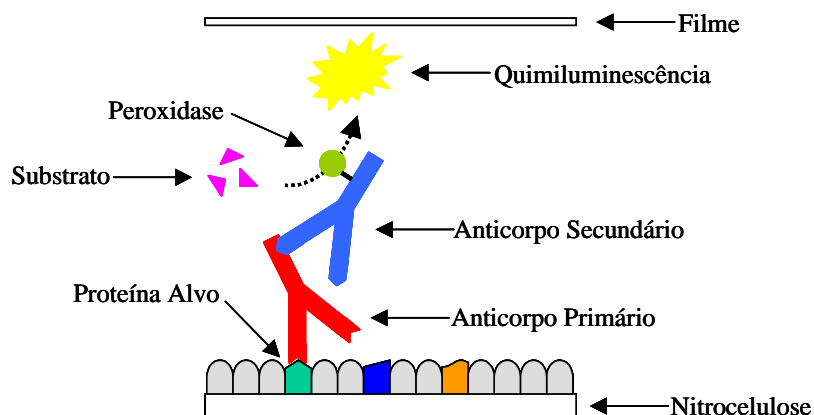


Figura 5 - Imunodeteção, através de quimiluminescência, de um polipeptídeo usando anticorpo específico.

3.13 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas foram dosadas através do método de Peterson (1977). Sobre alíquotas de 3 µl das amostras foram adicionados 397 µl de água e 400 µl do reagente de Lowry (0,2N de NaOH, 2,5% de SDS, 5% de Na₂CO₃, 0,2% de CuSO₄ e 0,1% de tartarato duplo de sódio e potássio). Em seguida foram adicionados 200µl do reagente de Folin 0,4N e incubadas por 30 minutos. A leitura foi realizada em 750nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA).

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA, seguido, quando apropriado, do teste de Duncan. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4-RESULTADOS

Os resultados obtidos estão divididos em:

- Estudos dos efeitos das lectinas ConBr e ConA *in vitro* na liberação de L-[³H] glutamato em sinaptossomas de ratas adultas:

- Avaliação da liberação de L-[³H] glutamato em condições basais na presença das lectinas ConBr e ConA;
- Avaliação da viabilidade de sinaptossomas tratados com as lectinas ConBr e ConA;
- Avaliação da liberação de L-[³H] glutamato estimulada por KCl e α -latrotoxina na presença de ConBr;
- Determinação da fosforilação de MAPKs por ConBr e ConA;

- Estudos dos efeitos de ConBr e ConA *in vitro* utilizando fatias hipocâmpais de ratas adultas:

- Análise da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratas adultas expostas às lectinas ConBr e ConA;
- Determinação da fosforilação de ERK1/2 por ConBr.

- Estudos dos efeitos das lectinas ConBr e ConA *in vitro* em linhagens de células tumorais C6 e U-937:

- Análise da viabilidade de células C6 tratadas com ConBr e ConA;
- Observação da fosforilação de ERK1/2 em células C6 tratadas com ConBr e ConA;
- Análise da viabilidade celular de células U-937 tratadas com ConBr.

4.1. ESTUDOS DOS EFEITOS DE CONBR E CONA *IN VITRO* NA LIBERAÇÃO DE L-[³H] GLUTAMATO EM SINAPTOSSOMAS DE RATAS ADULTAS.

4.1.1 - Avaliação da liberação de L-[³H] glutamato em condições basais na presença da lectina ConBr

Sinaptossomas de ratas adultas (60 dias) foram incubados com a lectina ConBr em concentrações de 5, 10 e 100 µg/ml por períodos de 1, 2 e 5 minutos. Como controle, os sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A Figura 6 mostra que a lectina ConBr, nas concentrações utilizadas, não induziu a liberação de L-[³H] glutamato em condições basais de maneira dependente de dose ou tempo. Foi utilizado KCl 40 mM como controle positivo de despolarização. Foi observado o aumento significativo da liberação de L-[³H] glutamato estimulada por KCl em relação ao controle nos três tempos utilizados.

Como visto anteriormente, as lectinas Diocleinae apresentam como especificidade principal de reconhecimento os carboidratos D-manose e D-glicose (Cavada *et al.*, 2001). Assim, podendo servir como inibidores da atividade destas lectinas. Para avaliar uma possível influência da glicose, presente no tampão HEPES-salina, sobre o efeito de ConBr, foram realizados experimentos de liberação de L-[³H] glutamato em condições basais sem a presença de glicose no tampão. A Figura 7 representa o resultado obtido da liberação de L-[³H] glutamato na ausência de glicose. Este resultado mostra que a ausência de glicose no tampão utilizado não alterou a resposta de liberação de L-[³H] glutamato em condições basais, em resposta a ConBr.

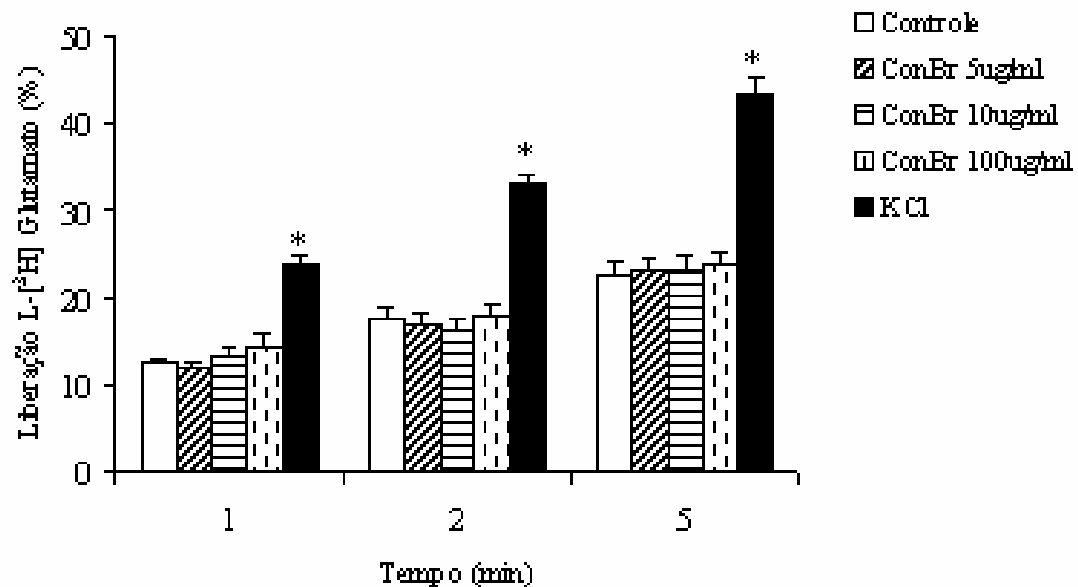


Figura 6 - Curva de tempo e dose-resposta da liberação de L-[³H] glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas na presença ou ausência de ConBr e KCl. Sinaptossomas obtidos como descrito anteriormente, foram incubados por 15 minutos a 37°C com L-[³H] glutamato. Após três lavagens, os sinaptossomas foram incubados durante 1, 2 e 5 minutos em ausência ou presença de ConBr nas concentrações de 5, 10 e 100 µg/ml ou KCl 40 mM. A contagem da radioatividade liberada foi realizada por cintilação líquida. Os resultados representam a média de quatro experimentos ± erro padrão e são expressos como percentuais do controle. * p < 0,05 em relação ao controle.

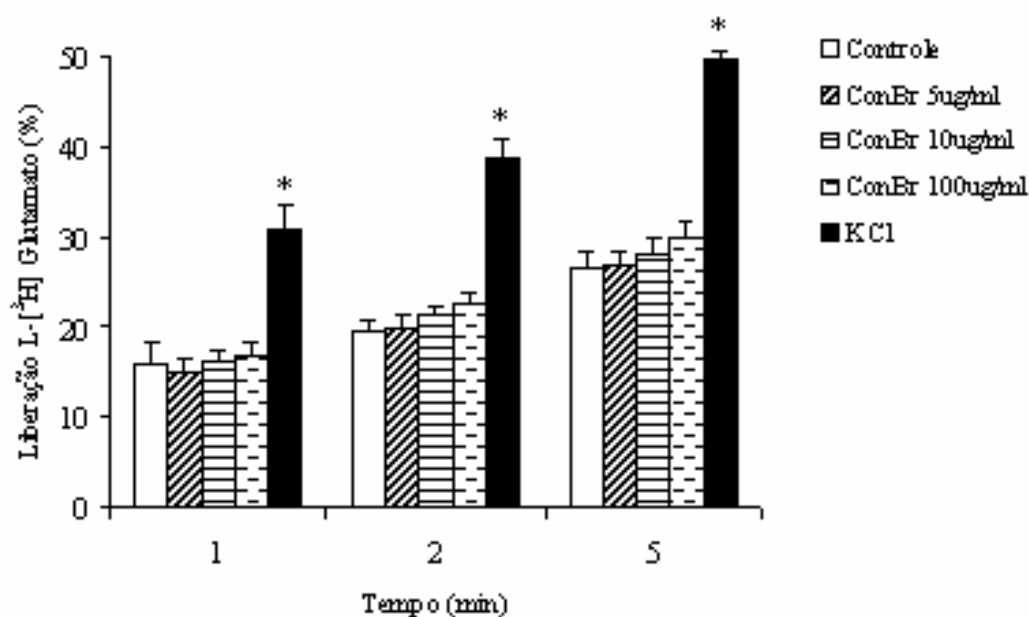


Figura 7 - Curva de tempo e dose-resposta da liberação de L-[³H] glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas na ausência de glicose e na presença ou ausência de ConBr e KCl. Sinaptossomas obtidos como descrito anteriormente, foram incubados por 15 minutos a 37°C com L-[³H] glutamato. Após três lavagens, os sinaptossomas foram incubados durante 1, 2 e 5 minutos em ausência ou presença de ConBr nas concentrações de 5, 10 e 100 µg/ml ou KCl 40 mM. A contagem da radioatividade liberada foi realizada por cintilação líquida. Os resultados representam a média de quatro experimentos ± erro padrão e são expressos como percentuais do controle. * p < 0,05 em relação ao controle.

4.1.2 - Avaliação da liberação de L-[³H] glutamato em condições basais na presença da lectina ConA

Sinaptossomas de ratas adultas foram incubados com a lectina ConA em concentrações de 5, 10 e 100 µg/ml por períodos de 1, 2 e 5 minutos. Para controle os sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A Figura 8 mostra que a lectina ConA nas concentrações utilizadas não alterou significativamente a liberação de L-[³H] glutamato em condições basais em relação ao controle de maneira dependente de dose e tempo. Foi utilizado como controle positivo de despolarização KCl 40 mM e foi observado o aumento significativo da liberação de L-[³H] glutamato estimulada por KCl em relação ao controle nos três tempos utilizados.

4.1.3 - Avaliação da viabilidade de sinaptossomas tratados com a lectina ConBr

Para avaliar a viabilidade dos sinaptossomas tratados com a lectina ConBr, foi utilizado o método de liberação extracelular da enzima LDH, um marcador citosólico. A Figura 9 mostra que os sinaptossomas incubados por 1, 2 e 5 minutos com ConBr 5, 10 e 100 µg/ml, não apresentaram um aumento significativo da liberação de LDH, em relação ao controle. O resultado indica que a lectina ConBr não provocou lise da membrana sinaptossomal. KCl utilizado como controle positivo de despolarização também não provocou ruptura da membrana sinaptossomal nos tempos utilizados.

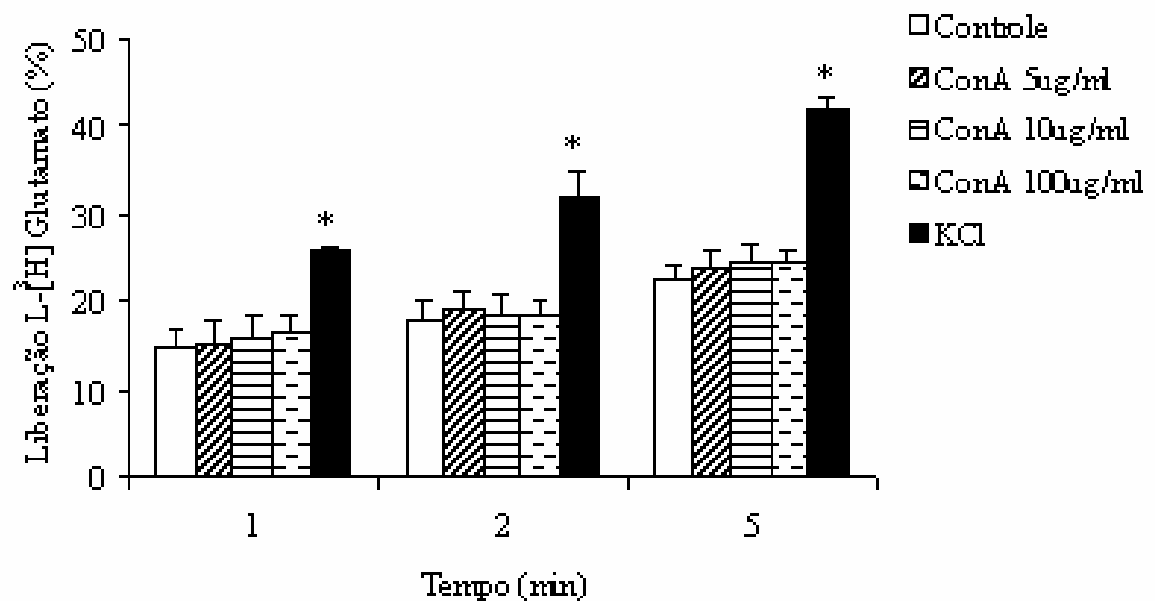


Figura 8. Curva de tempo e dose-resposta da liberação de L-[³H] glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas na presença ou ausência de ConA e KCl. Sinaptossomas obtidos como descrito anteriormente, foram incubados por 15 minutos a 37°C com L-[³H] glutamato. Após três lavagens, os sinaptossomas foram incubados durante 1, 2 e 5 minutos em ausência ou presença de ConA nas concentrações de 5, 10 e 100 µg/ml ou KCl 40 mM. A contagem da radioatividade liberada foi realizada por cintilação líquida. Os resultados representam a média de quatro experimentos ± erro padrão e são expressos como percentuais do controle. * p < 0,05 em relação ao controle.

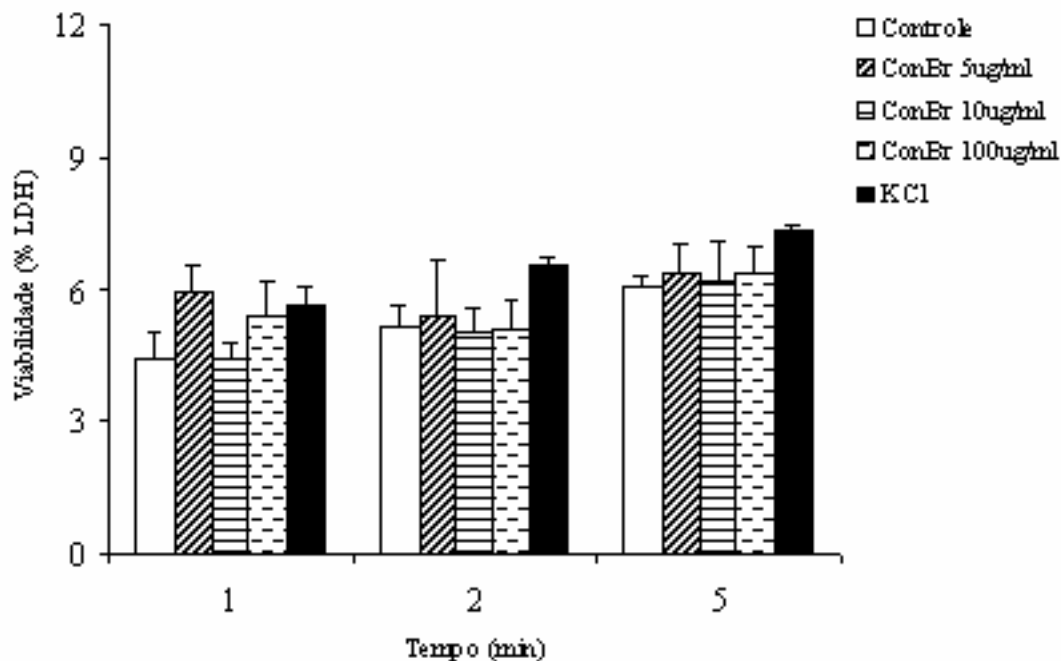


Figura 9. Liberação de LDH em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas incubados com ConBr e KCl. Sinaptossomas foram incubados na ausência (controle) ou na presença de ConBr 5, 10 e 100 µg/ml ou de KCl 40 mM durante 1, 2 e 5 minutos a 37°C. Os sinaptossomas foram centrifugados e o precipitado separado do sobrenadante. A dosagem de LDH foi realizada utilizando um “kit” de determinação de LDH. A LDH intracelular foi determinada pela adição de 10% de Triton X-100. A atividade da LDH no meio extracelular foi expressa como percentual da atividade total (LDH sobrenadante somada a LDH intracelular). Os resultados representam a média de três experimentos \pm erro padrão e são expressos como percentuais do controle.

4.1.4 - Avaliação da viabilidade de sinaptossomas tratados com a lectina ConA

A ruptura dos sinaptossomas foi avaliada através da dosagem de liberação de LDH, como descrito anteriormente. A Figura 10 mostra que os sinaptossomas incubados durante 1, 2 e 5 minutos na presença de ConA 5, 10 e 100 µg/ml, não apresentaram um aumento significativo da liberação de LDH, em relação ao controle. O resultado indica que a lectina ConA e KCl também não provocaram lise da membrana sinaptossomal.

4.1.5 - Avaliação da liberação de L-[³H] glutamato estimulada por KCl na presença de ConBr

Este experimento foi realizado para verificar a integridade funcional dos sinaptossomas tratados com ConBr. Os sinaptossomas foram incubados em presença de KCl 40 mM como controle positivo de liberação de L-[³H] glutamato. A Figura 11 mostra que a incubação dos sinaptossomas em KCl na presença de ConBr 5 µg/ml (A), 10 µg/ml (B) e 100 µg/ml (C), por 1 e 5 minutos não alterou significativamente a liberação de L-[³H] glutamato induzida por KCl. Mesmo na presença da lectina ConBr, KCl foi capaz de induzir a despolarização e a conseqüente liberação de L-[³H] glutamato, indicando que os sinaptossomas permaneciam funcionais.

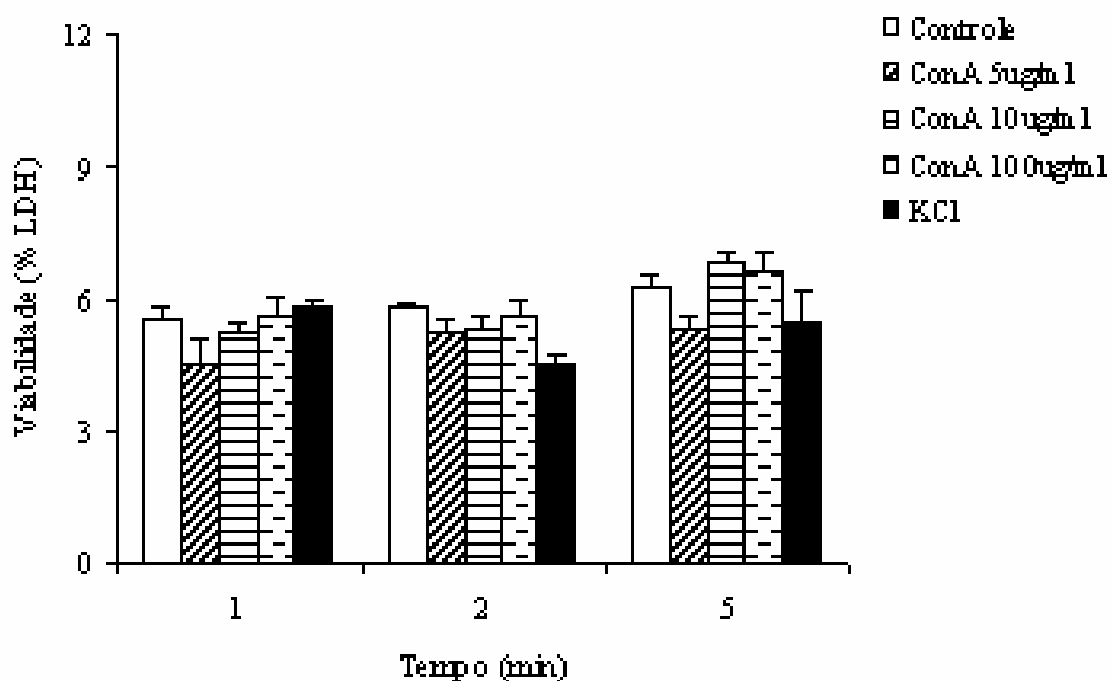


Figura 10. Liberação de LDH em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas incubados com ConA e KCl. Sinaptossomas foram incubados na ausência (controle) ou na presença de ConA 5, 10 e 100 µg/ml ou de KCl 40 mM durante 1, 2 e 5 minutos a 37°C. Os sinaptossomas foram centrifugados e o precipitado separado do sobrenadante. A dosagem de LDH foi realizada utilizando um “kit” de determinação de LDH. A LDH intracelular foi determinada pela adição de 10% de Triton X-100. A atividade da LDH no meio extracelular foi expressa como percentual da atividade total (LDH sobrenadante somada a LDH intracelular). Os resultados representam a média de três experimentos \pm erro padrão e são expressos como percentuais do controle.

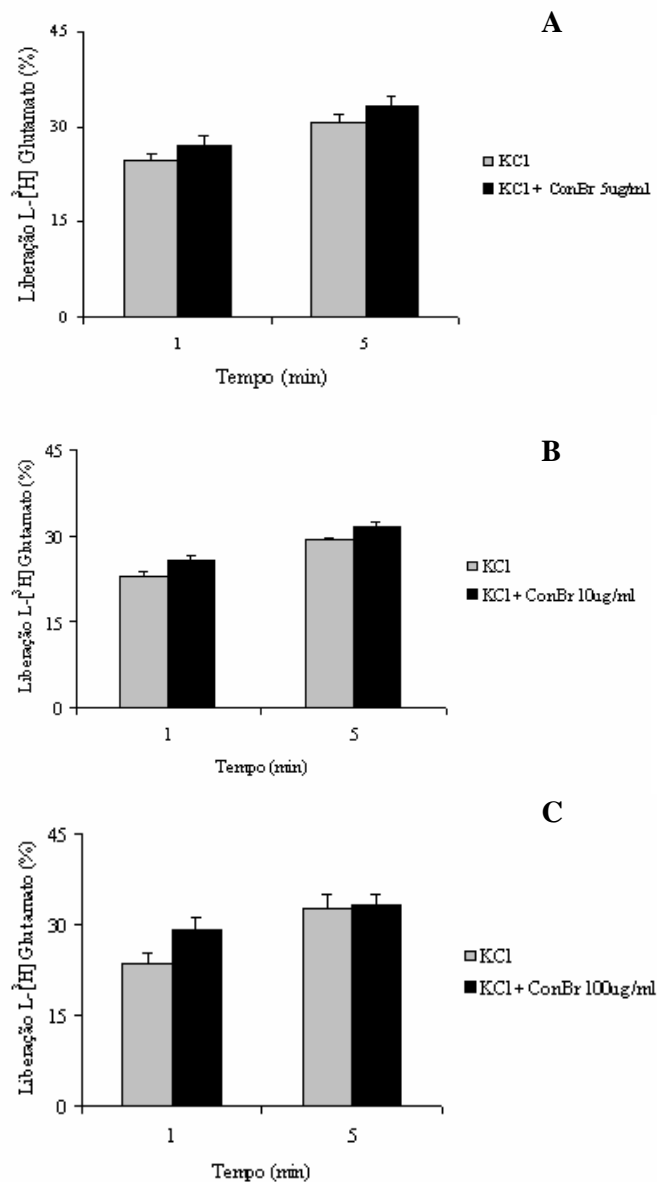


Figura 11. Liberação de L-[³H] glutamato induzida por KCl em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas incubados com ConBr. Sinaptossomas marcados com L-[³H] glutamato e tratados como indicado acima foram incubados durante 1 e 5 minutos na ausência ou na presença de ConBr 5 µg/ml (A), ConBr 10 µg/ml (B) e ConBr 100 µg/ml (C) e KCl 40 mM. Posteriormente foram centrifugados e sua radioatividade lida por cintilação líquida. Os resultados representam a média de quatro experimentos ± erro padrão e são expressos como percentuais do controle.

4.1.6 - Avaliação da liberação de L-[³H] glutamato estimulada por α -latrotoxina na presença de ConBr

α -Latrotoxina é uma neurotoxina que se liga a determinados receptores nos terminais nervosos, causando uma estimulação intensa da liberação de neurotransmissores por exocitose (Khvotchev & Südhof, 2000). Tem sido demonstrado que a lectina ConA inibe a liberação de transmissores evocada por α -latrotoxina (Grasso et al., 1978, Meldolesi, 1982), sendo que este efeito inibitório envolve a união da lectina a receptores desta toxina (Boehm & Huck, 1998).

A figura 12 representa o experimento que foi realizado para avaliar o efeito da lectina ConBr sobre a liberação de L-[³H] glutamato estimulada por α -latrotoxina. Sinaptossomas foram incubados por 5 minutos em ausência (controle) ou presença de ConBr 100 ug/ml e/ou α -latrotoxina 1 nM. KCl 40mM foi utilizado como controle positivo de liberação de L-[³H] glutamato. Os resultados mostraram que a liberação basal de L-[³H] glutamato foi de 21%. α -Latrotoxina aumentou a liberação de L-[³H] glutamato para 30% (43% de aumento em relação ao controle). A lectina ConBr por si só não alterou a liberação de L-[³H] glutamato de maneira significativa, promovendo apenas 23% de liberação de L-[³H] glutamato. Porém, quando incubada junto com α -latrotoxina, a liberação de L-[³H] glutamato foi incrementada para 36% (um aumento de 20% no efeito de α -latrotoxina sozinha).

Apesar da homologia, as lectinas ConBr e ConA podem apresentar efeitos diferenciados, sugerindo que estas lectinas podem ser utilizadas como possíveis ferramentas em estudos de transmissão sináptica.

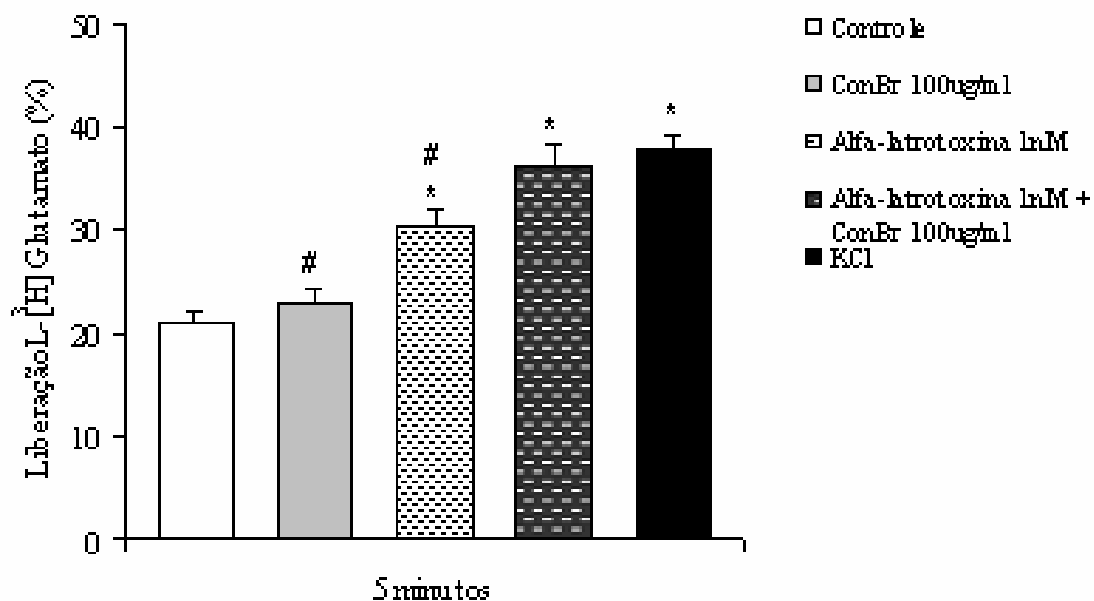


Figura 12 - Efeito da lectina ConBr na liberação de L-[³H] glutamato induzida por α -latrotoxina em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas. Sinaptossomas marcados com L-[³H] glutamato foram incubados por 5 minutos em ausência (controle) ou presença de ConBr 100 ug/ml e/ou α -latrotoxina 1 nM. KCl 33mM foi utilizado como controle positivo de liberação de glutamato. Os resultados representam a média de cinco experimentos \pm erro padrão. * Resultados estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$). # Resultados estatisticamente diferentes de α -latrotoxina 1 nM + ConBr 100 ug/ml ($p < 0,05$).

4.1.7 - Determinação da fosforilação de MAPKs por ConBr e ConA

4.1.7.1 - Análise da Fosforilação de ERK1/2 em Sinaptossomas de Ratas Adultas Incubadas com ConBr *in vitro*

Estudos têm demonstrado que a ativação de receptores acoplados a proteína-G e o aumento no influxo de íons cálcio intracelular em resposta a despolarização por KCl ou estimulação dos receptores de glutamato podem induzir a ativação de ERK por mecanismos ainda não conhecidos (Pereira *et al.*, 2002). Entretanto, nenhum estudo mostrou a modulação de ERK em sinaptossomas na presença de lectinas.

Dessa maneira, foi analisada a modulação de ERK1/2 em sinaptossomas incubados com ConBr nas concentrações 5, 10 e 100 µg/ml e com KCl 40 mM, nos tempos de 1, 2 e 5 minutos. Para controle sinaptossomas foram incubados com tampão Hepes-salina. As Figuras 13A, 14A e 15A mostram os imunoblottings da fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas incubados com ConBr e KCl em períodos de 1, 2 e 5 minutos, respectivamente. O imunoconteúdo das ERK1/2 não foi alterado em nenhum tempo de incubação e concentração utilizados (Figuras 13B, 14B e 15B). A quantificação das bandas é mostrada nas Figuras 13C, 14C e 15C para os tempos de incubação de 1, 2 e 5 minutos, respectivamente. A fosforilação de ERK foi expressa como porcentagem do controle (considerado 100%).

KCl não modificou a fosforilação das ERK 1/2 em relação ao controle em 1 e 5 minutos de incubação. Porém, houve um aumento significativo de ERK 2 no período de incubação de 2 minutos. ConBr provocou um aumento significativo apenas da ERK 1 no tempo de 1 minuto de incubação na concentração de 100 µg/ml. Na incubação de 2 minutos, ConBr aumentou significativamente a fosforilação de ERK 1 nas três concentrações utilizadas

e de ERK 2 apenas nas concentrações de 5 e 100 $\mu\text{g/ml}$. No tempo de incubação de 5 minutos foi observado aumento significativo da fosforilação de ERK 1 e 2 nas três concentrações de ConBr utilizadas no estudo.

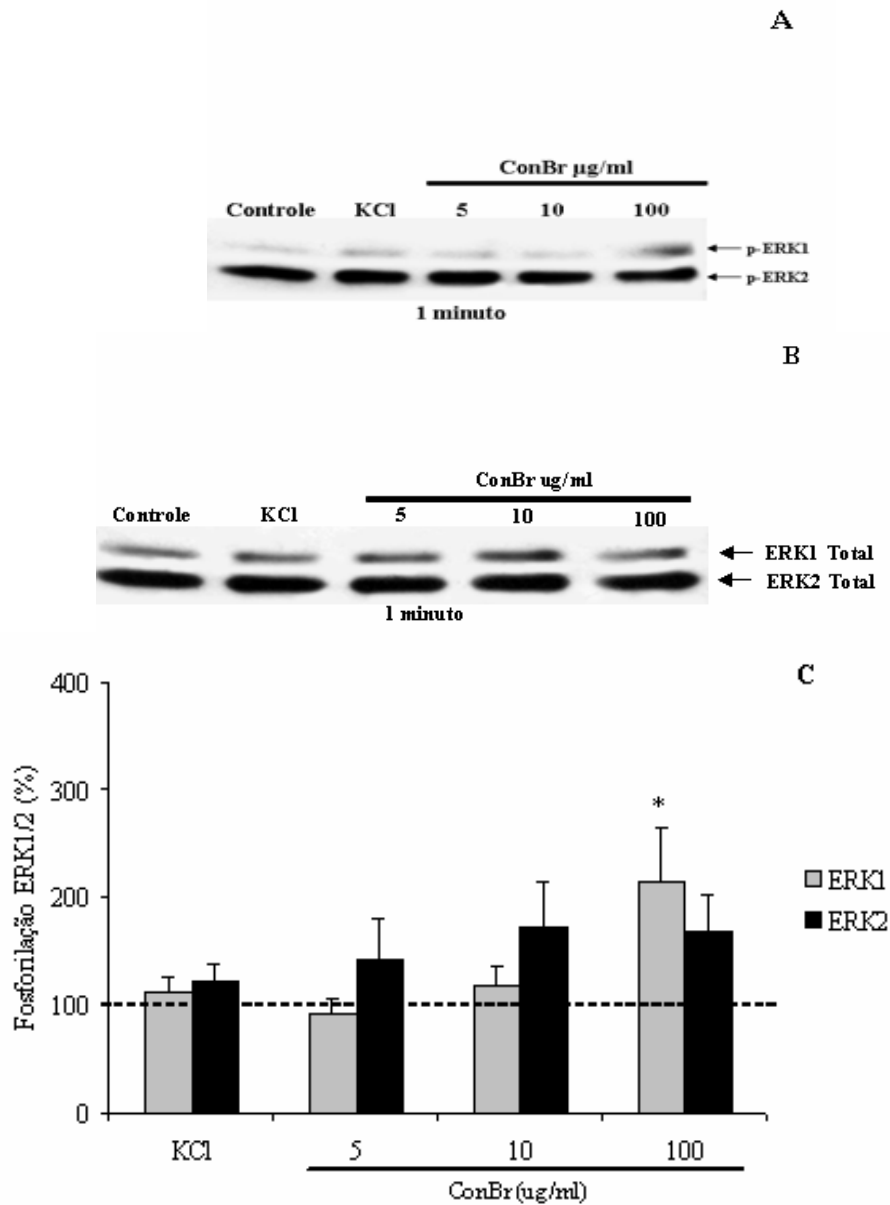


Figura 13 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 1 minuto. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Imunoconteúdo de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. Sinaptossomas foram incubados com diferentes concentrações de ConBr e KCl 40 mM durante 1 minuto. Para controle sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 4$; * $p < 0,05$, diferenças significativas em relação ao controle.

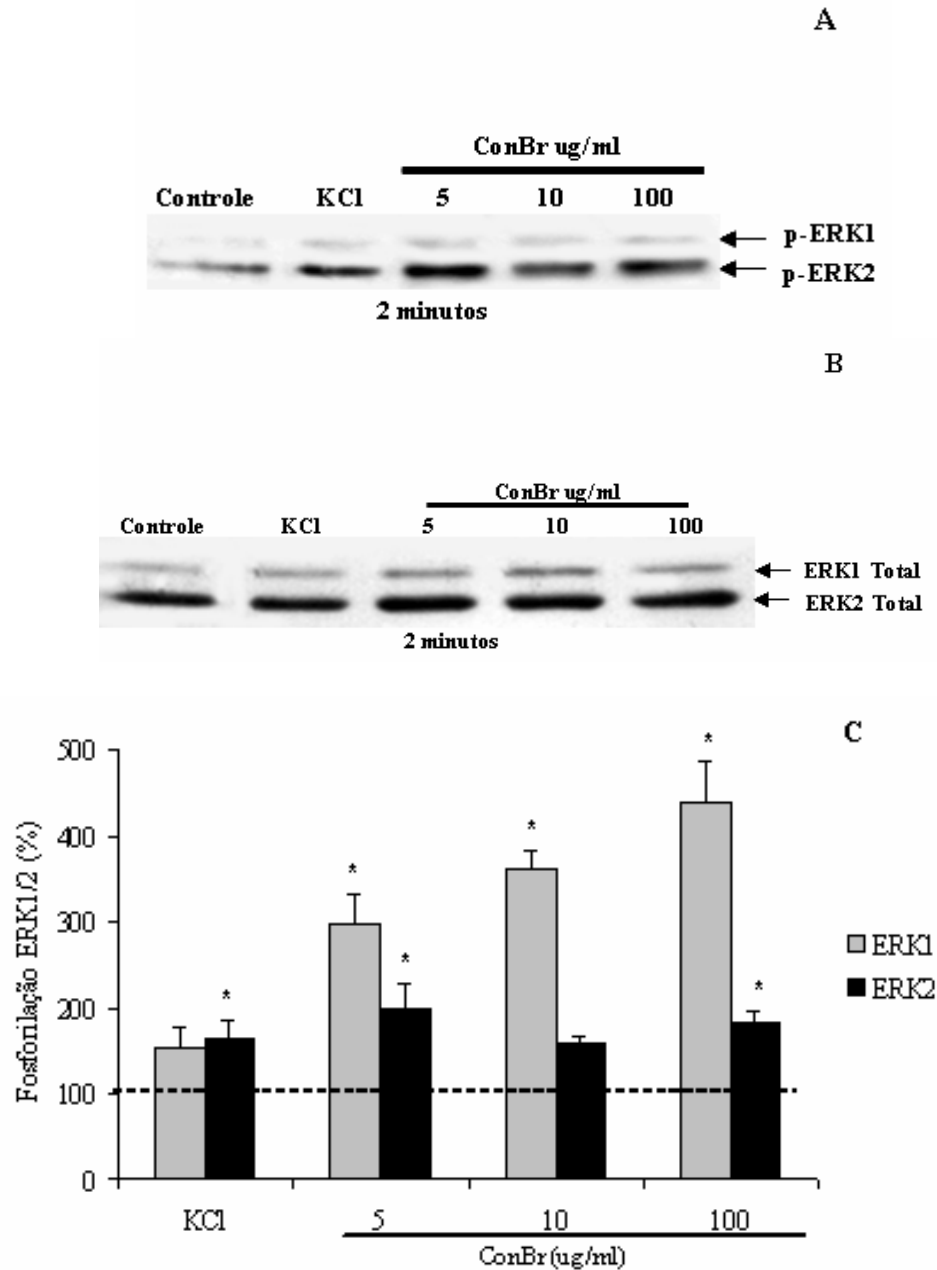


Figura 14 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 2 minutos. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Imunoconteúdo de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. Sinaptossomas foram incubados com diferentes concentrações de ConBr e KCl 40 mM durante 2 minutos. Para controle sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 3$; * $p < 0,05$, diferenças significativas em relação ao controle.

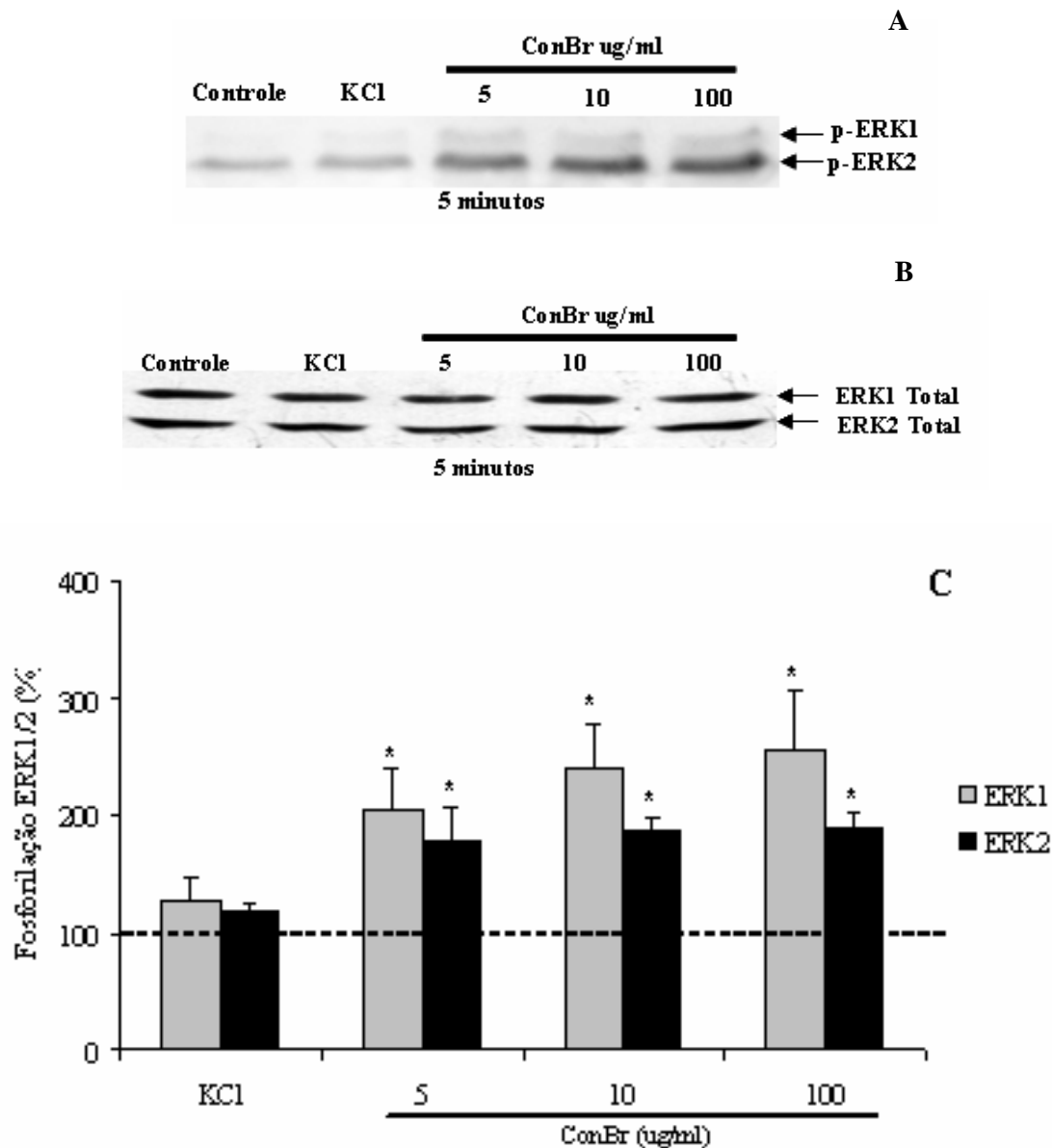


Figura 15 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 5 minutos. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Imunoconteúdo de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. Sinaptossomas foram incubados com diferentes concentrações de ConBr e KCl 40mM durante 5 minutos. Para controle sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). n = 4; * p < 0,05 em diferenças significativas em relação ao controle.

4.1.7.2 - Análise da Fosforilação de ERK1/2 em Sinaptossomas de Ratas Adultas Incubadas com a lectina ConA *in vitro*

Considerando que lectinas com similaridades estruturais, podem apresentar efeitos biológicos diferenciados (Cavada *et al.*, 2001), foi realizado uma comparação na atividade de ConA sobre a fosforilação de ERK1/2 em relação a esta atividade observada em ConBr.

Dessa maneira, foi analisada a modulação de ERK1/2 em sinaptossomas incubados com ConA nas concentrações 5, 10 e 100 µg/ml e com KCl 40 mM, nos tempos de 1, 2 e 5 minutos. Como controle, os sinaptossomas foram incubados com tampão Hepes-salina. As Figuras 16A, 17A e 18A mostram os imunoblottings da fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas incubados com ConA e KCl em períodos de 1, 2 e 5 minutos, respectivamente. O imunoconteúdo das ERK1/2 não foi alterado em nenhum tempo de incubação e concentração utilizados (Figuras 16B, 17B e 18B). A quantificação das bandas é mostrada nas Figuras 16C, 17C e 18C para os tempos de incubação de 1, 2 e 5 minutos, respectivamente. A fosforilação de ERK foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%).

Como visto anteriormente, KCl não modificou a fosforilação das ERK 1/2 em relação ao controle em 1 e 5 minutos de incubação. Porém, houve um aumento significativo somente da ERK 2 no período de incubação de 2 minutos. Ao contrário da lectina ConBr, a ConA não alterou a fosforilação de ERK 1 e 2 em nenhum tempo e concentrações utilizados em sinaptossomas.

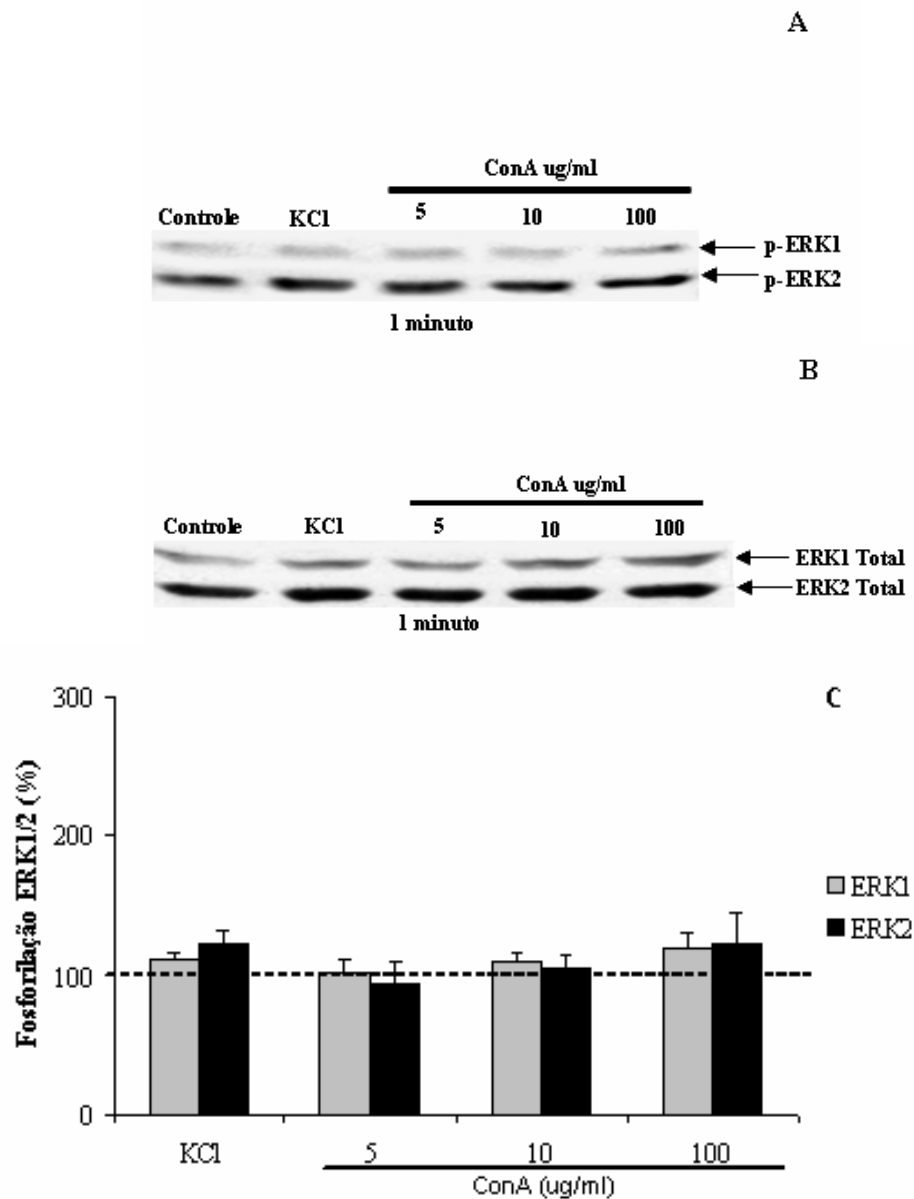


Figura 16 - Efeito da lectina ConA e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 1 minuto. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Imunoconteúdo de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. Sinaptossomas foram incubados com diferentes concentrações de ConA e KCl 40 mM durante 1 minuto. Para controle sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 4$; $p > 0,05$, diferenças não significativas em relação ao controle.

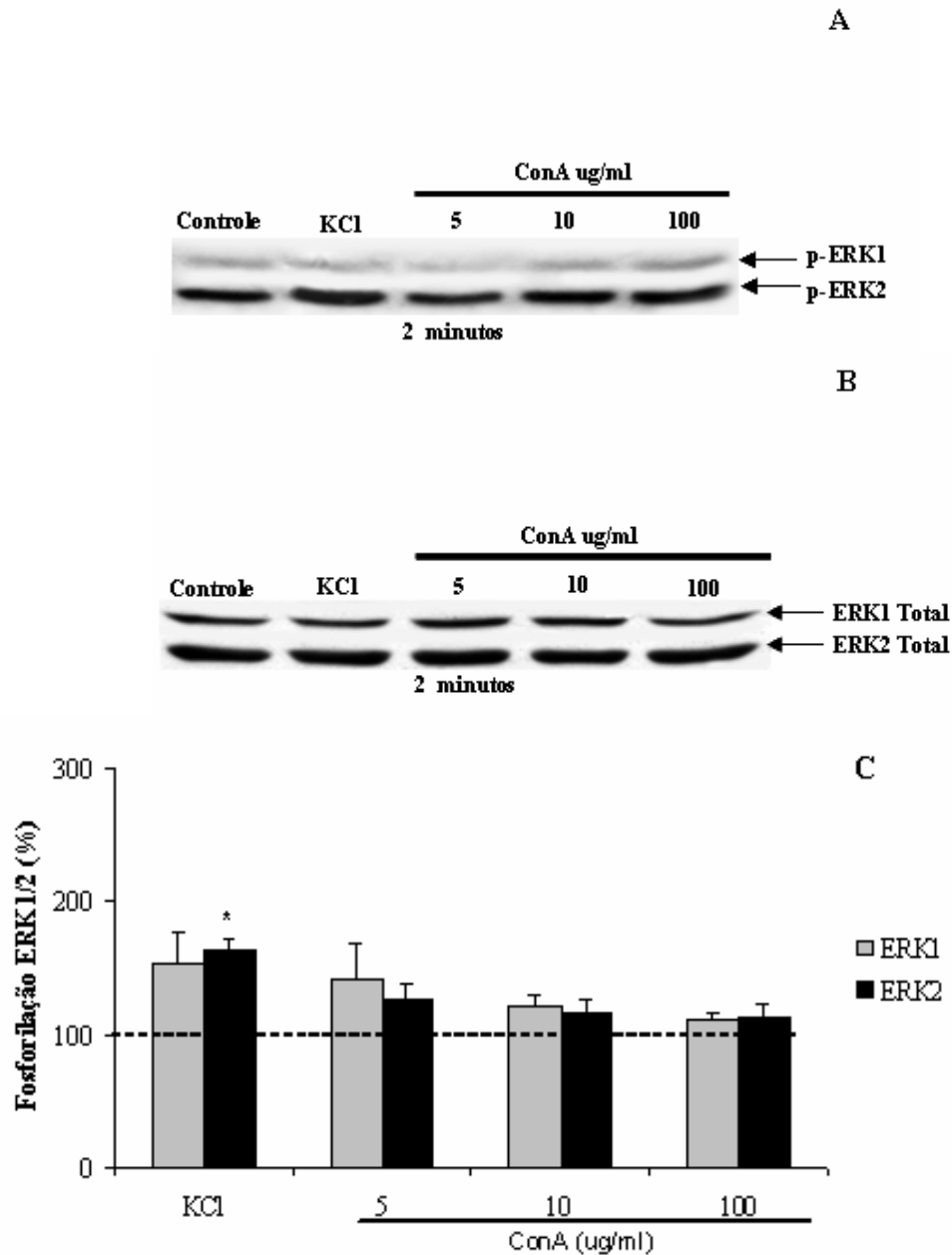


Figura 17 - Efeito da lectina ConA e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 2 minutos. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Imunoconteúdo de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. Sinaptossomas foram incubados com diferentes concentrações de ConA e KCl 40 mM durante 2 minutos. Para controle sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 4$; * $p < 0,05$, diferenças significativas em relação ao controle.

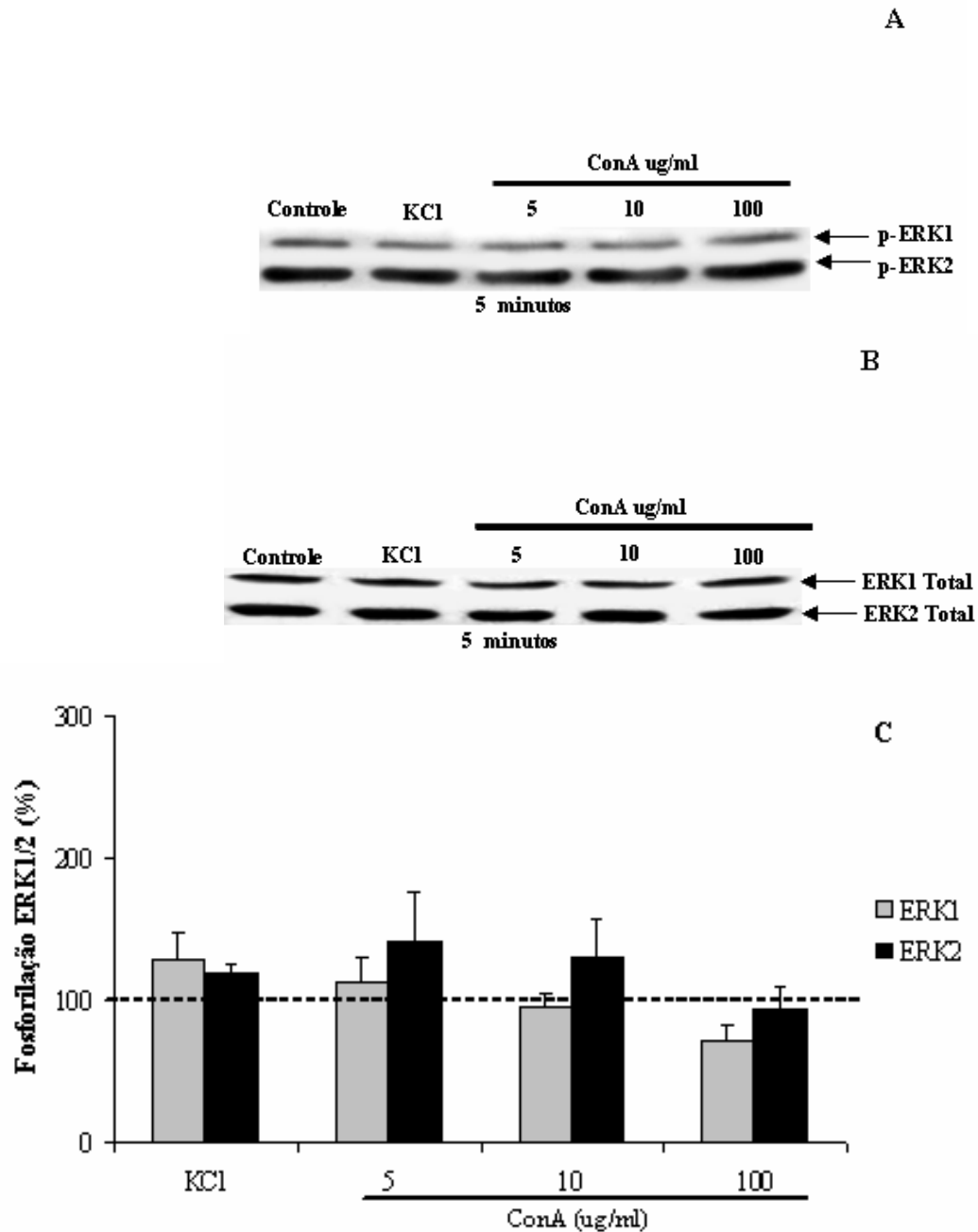


Figura 18 - Efeito da lectina ConA e KCl sobre a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 5 minutos. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Imunoconteúdo de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. Sinaptossomas foram incubados com diferentes concentrações de ConA e KCl 40 mM durante 5 minutos. Para controle sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 4$; $p > 0,05$, diferenças não significativas em relação ao controle.

4.1.7.3 - Análise da Fosforilação de JNK 1/2 em Sinaptossomas de Ratas Adultas Incubadas com ConBr *in vitro*

Alguns trabalhos têm demonstrado que lectinas de plantas podem apresentar atividade no aumento da fosforilação de JNK-1 em alguns tipos de células como timócitos (Pani *et al.*, 2000) e células tumorais U-937 (Park *et al.*, 2000). Tendo em vista que não há trabalhos demonstrando a atividade da lectina ConBr sobre a ativação de JNK em sinaptossomas, foram realizados experimentos para avaliar a atividade de ConBr sobre a fosforilação de JNK1/2 em modelos de sinaptossomas.

Dessa maneira, foi analisada a modulação de JNK1/2 em sinaptossomas incubados com ConBr nas concentrações 5, 10 e 100 µg/ml e com KCl 40 mM, nos tempos de 1, 2 e 5 minutos. Para controle sinaptossomas foram incubados com tampão Hepes-salina. As Figuras 19A, 20A e 21A mostram os imunoblottings da fosforilação de JNK1/2 em sinaptossomas incubados com ConBr e KCl em períodos de 1, 2 e 5 minutos, respectivamente. O imunoc conteúdo das JNK1/2 não foi alterado em nenhum tempo de incubação e concentração utilizados (Figuras 19B, 20B e 21B). A quantificação das bandas é mostrada nas Figuras 19C, 20C e 21C para os tempos de incubação de 1, 2 e 5 minutos, respectivamente. A fosforilação de JNK foi expressa em porcentagem do controle (considerado 100%).

KCl não modificou a fosforilação das JNK 1/2 em relação ao controle em 1, 2 e 5 minutos de incubação. Também não foi observado aumento significativo da fosforilação de JNK 1 e 2 em nenhum tempo e concentrações utilizados para incubações de sinaptossomas com a lectina ConBr.

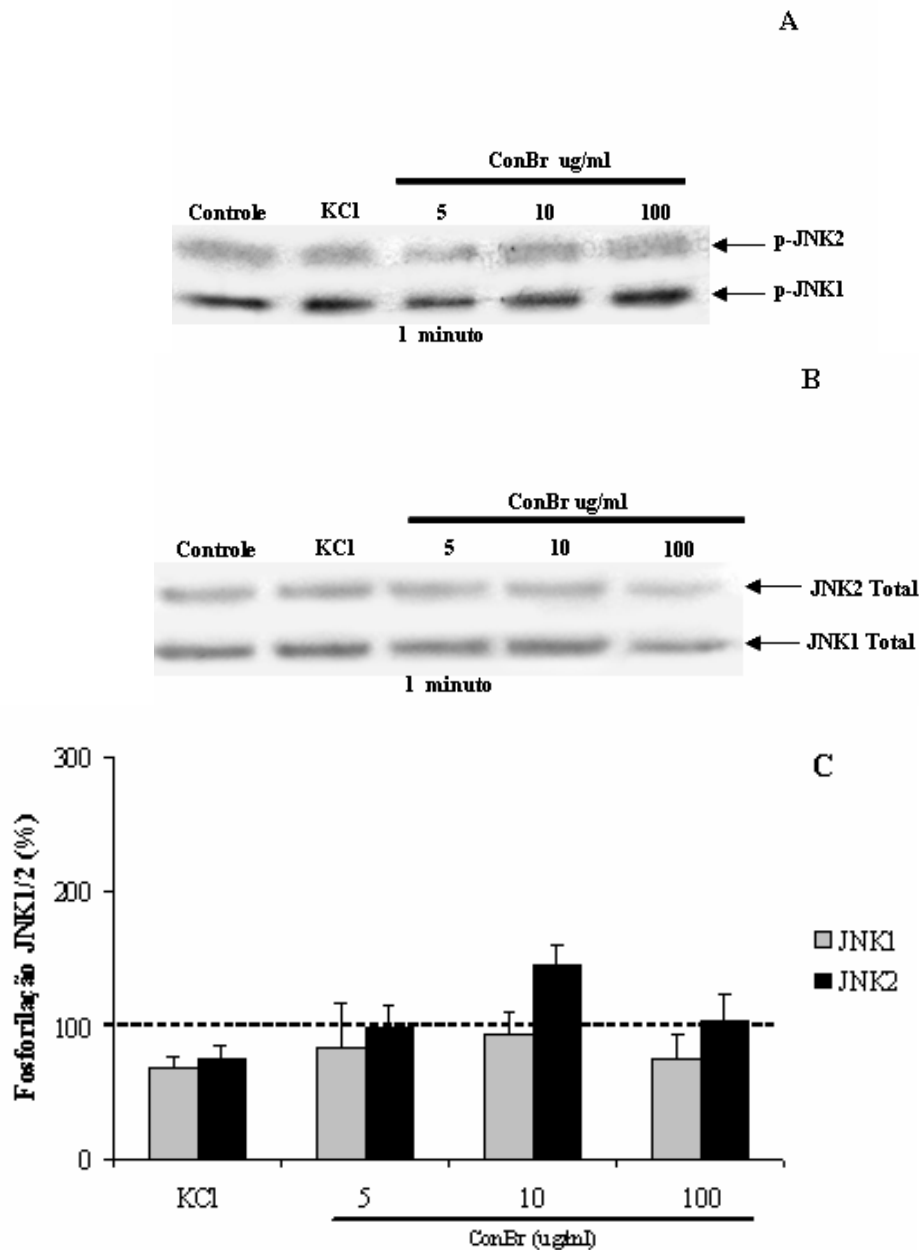


Figura 19 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de JNK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 1 minuto. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-JNK1/2. (B) Imunoconteúdo de JNK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. Sinaptossomas foram incubados com diferentes concentrações de ConBr e KCl 40 mM durante 1 minuto. Para controle sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de JNK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 3$; $p > 0,05$, diferenças não significativas em relação ao controle.

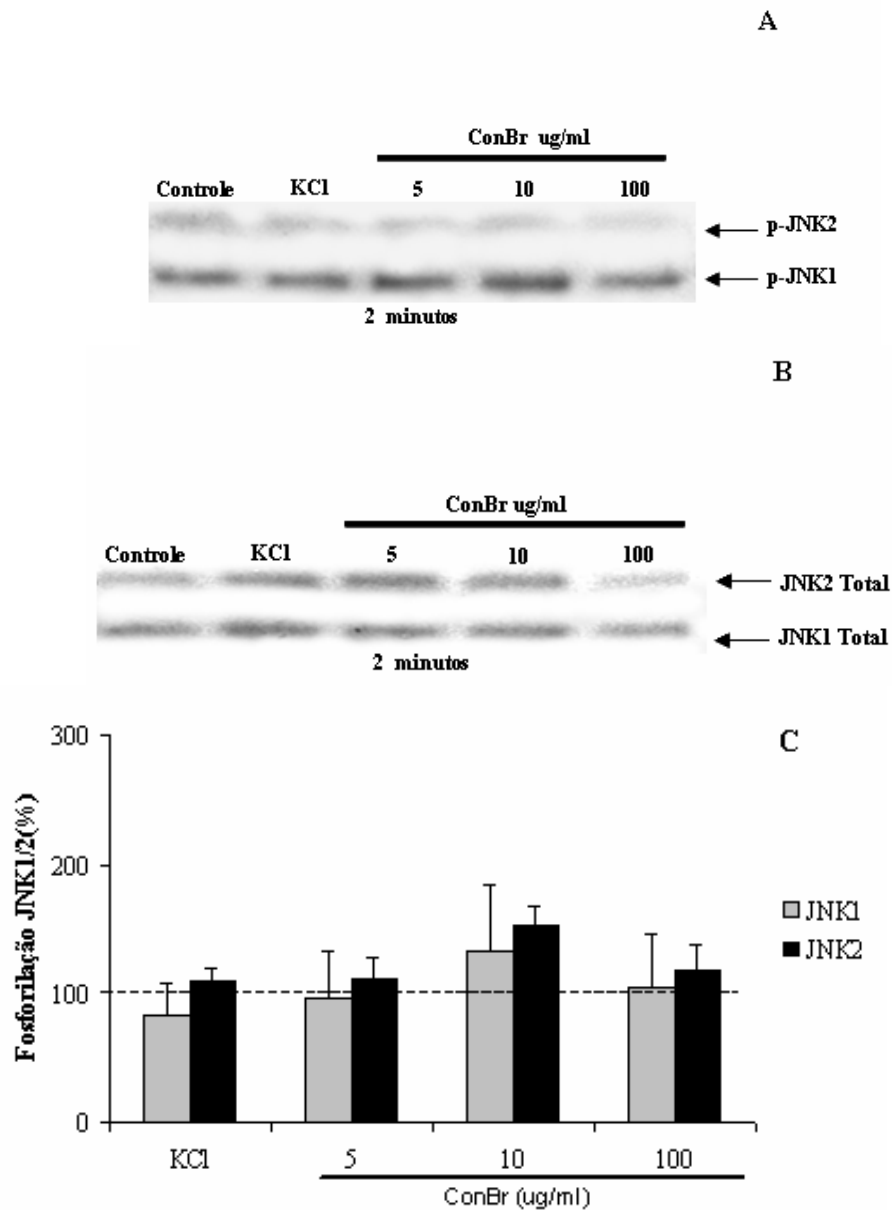


Figura 20 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de JNK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 2 minutos. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-JNK1/2. (B) Imunoconteúdo de JNK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. Sinaptossomas foram incubados com diferentes concentrações de ConBr e KCl 40 mM durante 2 minutos. Para controle sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de JNK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 4$; $p > 0,05$, diferenças não significativas em relação ao controle.

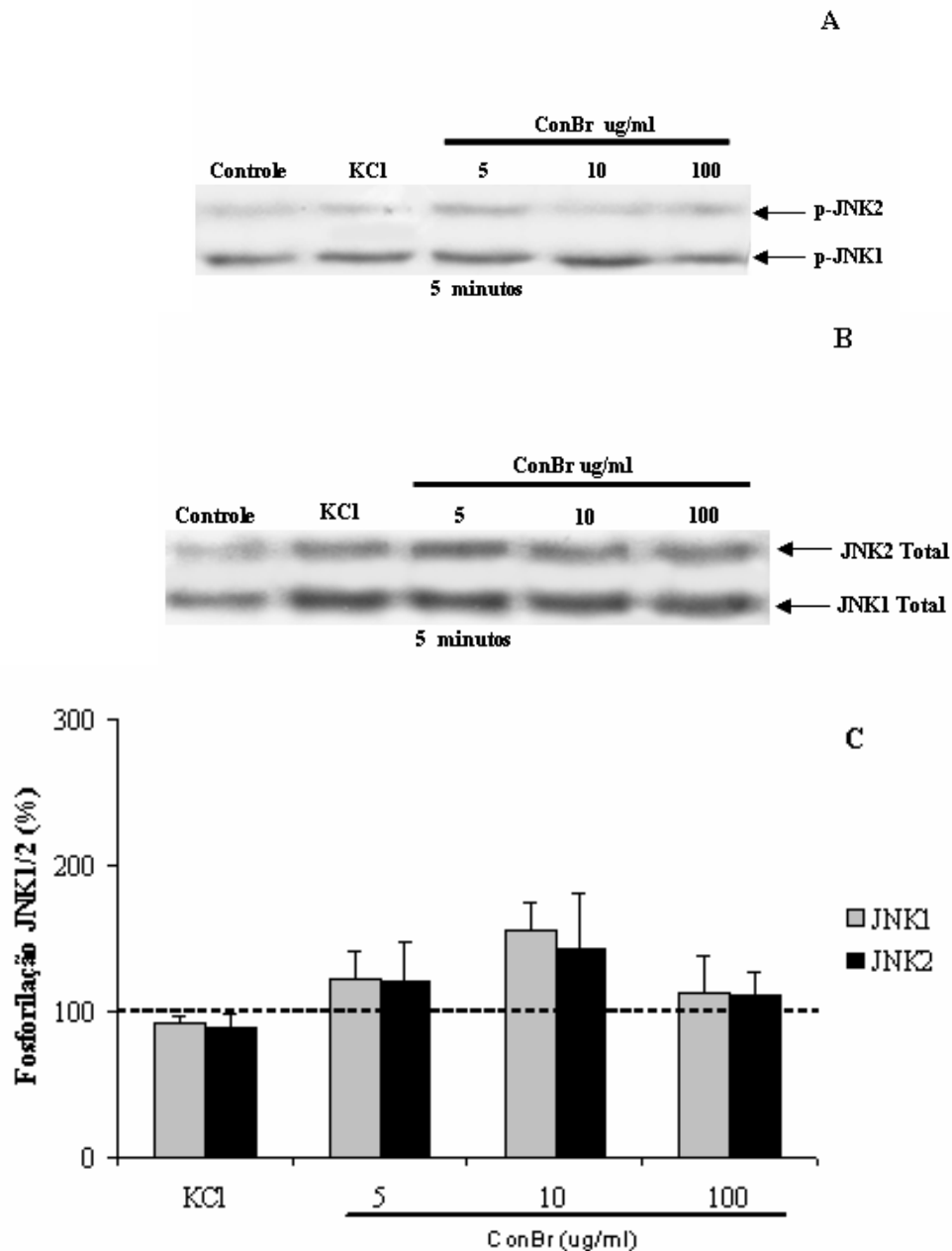


Figura 21 - Efeito da lectina ConBr e KCl sobre a fosforilação de JNK1/2 em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas em incubações de 5 minutos. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-JNK1/2. (B) Imunoconteúdo de JNK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. Sinaptossomas foram incubados com diferentes concentrações de ConBr e KCl 40 mM durante 5 minutos. Para controle sinaptossomas foram incubados apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de JNK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 4$; $p > 0,05$, diferenças não significativas em relação ao controle.

4.2. ESTUDOS DOS EFEITOS DE CONBR E CONA *IN VITRO* UTILIZANDO FATIAS HIPOCAMPAIS DE RATAS ADULTAS

4.2.1 - Análise da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratas adultas expostas às lectina ConBr e ConA

Um outro modelo estudado neste trabalho são as fatias de hipocampo de ratas adultas.

Considerando a importância do mecanismo de transdução de sinais na plasticidade sináptica e na formação da memória (Sweatt, 2004) e as atividades das lectinas em diferentes tipos de células, nenhum estudo tem sido demonstrado em relação às atividades e viabilidade das lectinas ConBr e ConA em modelos de fatias hipocampais.

Foi determinado o efeito das lectinas ConBr e ConA sobre a viabilidade celular hipocampal. Fatias de hipocampo de ratas adultas (60 dias) foram incubadas com ConBr e ConA em concentrações de 5, 10 e 100 µg/ml por um período de 30 minutos. Para controle as fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A viabilidade celular, capacidade redutora sobre o MTT, foi expressa em porcentagem do controle (considerado 100%). A Figura 22 mostra o efeito das lectinas sobre a viabilidade celular em fatias hipocampais. As lectinas ConBr e ConA não causaram alteração significativa da viabilidade em nenhuma das concentrações testadas.

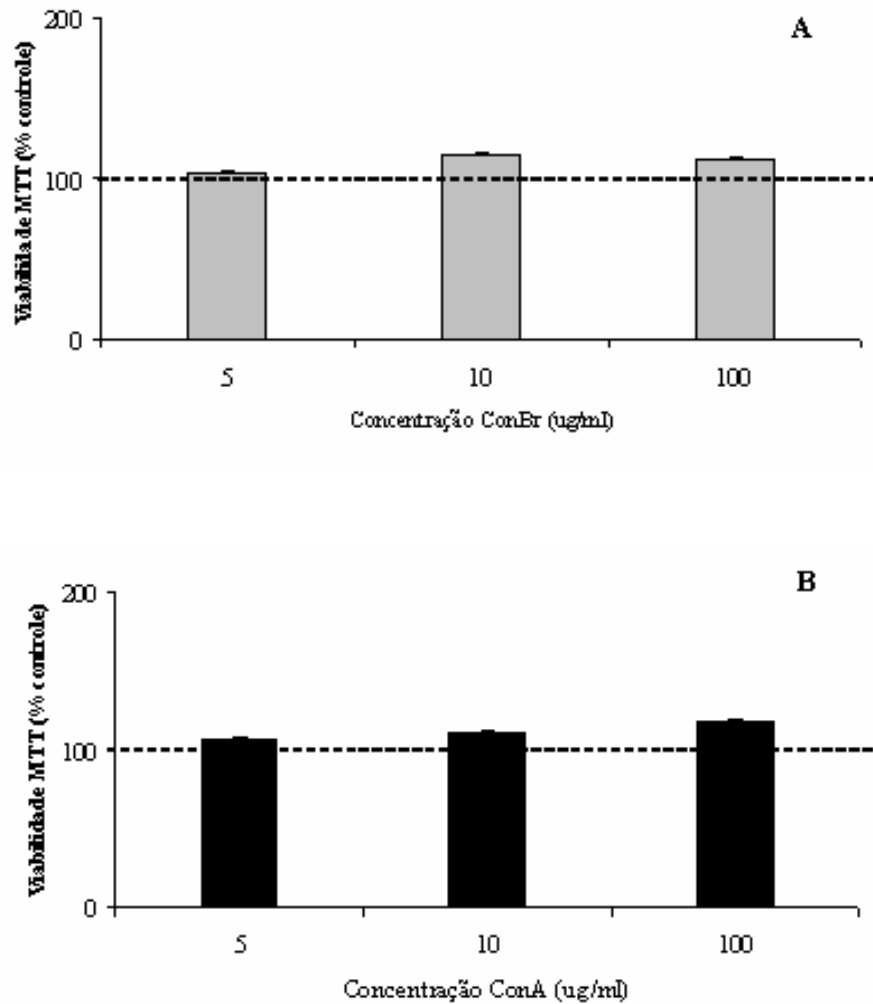


Figura 22 - Efeito de ConBr (A) e ConA (B) na redução do MTT em fatias de hipocampo de ratas adultas. Fatias Hipocampais foram incubadas com diferentes concentrações de ConBr ou ConA durante 30 minutos. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A viabilidade foi determinada pela capacidade de redução do MTT. Resultados representam média \pm erro padrão e são expressos como percentuais do controle (considerado 100%); $n = 3$; $p > 0,05$, diferenças não significativas em relação ao controle.

4.2.2 - Determinação da fosforilação de ERK 1/2 em fatias hipocampais incubadas com a lectina ConBr

Tendo em vista a demonstração da ação de ConBr sobre o terminal sináptico (sinaptossoma) e a capacidade de ConBr de modular a via de ERK1/2 nesta preparação, achamos importante avaliar a ação desta lectina no modelo de estruturas intactas, como as fatias hipocampais. O modelo de fatias tem sido muito utilizado no estudo de eventos de fosforilação protéica (Rodnight *et al.*, 1988; Leal *et al.*, 1997; Cordova *et al.*, 2004). A importância deste modelo está na conservação da integridade do tecido. As fatias mantêm uma grande parte da organização do tecido nervoso intacto, incluindo a presença de estruturas pré e pós-sinápticas, neurônios, astrócitos entre outras células, no ambiente fisiológico do cérebro, consistindo de matriz extracelular, conectividade neuronal e interações neurônio-glia. Além disso, proteínas como fosfatases e quinases permanecem praticamente nas mesmas condições do cérebro (Rodnight *et al.*, 1988; Gong *et al.*, 2001). Considerando, as diversas ações biológicas de lectinas vegetais sobre células de mamíferos (Cavada *et al.*, 2001) e o envolvimento de ERK sobre plasticidade neuronal (Sweatt, 2004), parece importante a caracterização dos efeitos biológicos de lectinas brasileiras, assim como ConBr sobre preparações do sistema nervoso central.

Entretanto, nenhum estudo mostrou a modulação de ERK em modelos de fatias hipocampais incubadas com a lectina ConBr. Foi analisada a modulação de ERK1/2 em fatias hipocampais de ratas adultas com ConBr em concentrações de 5, 10 e 100 µg/ml em tempos de 5 e 30 minutos. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. As Figuras 23A e 24A mostram os imunoblottings da fosforilação de ERK1/2 em fatias incubadas com ConBr em períodos de 5 e 30 minutos, respectivamente. A quantificação das

bandas é mostrada nas figuras 23B e 24B. A fosforilação de ERK foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). ConBr não modificou a fosforilação das ERK1/2 em 5 e 30 minutos de incubação.

A lectina ConBr não alterou o imunconteúdo das ERK1/2 em nenhuma das concentrações e tempos de incubação utilizados (dados não mostrados).

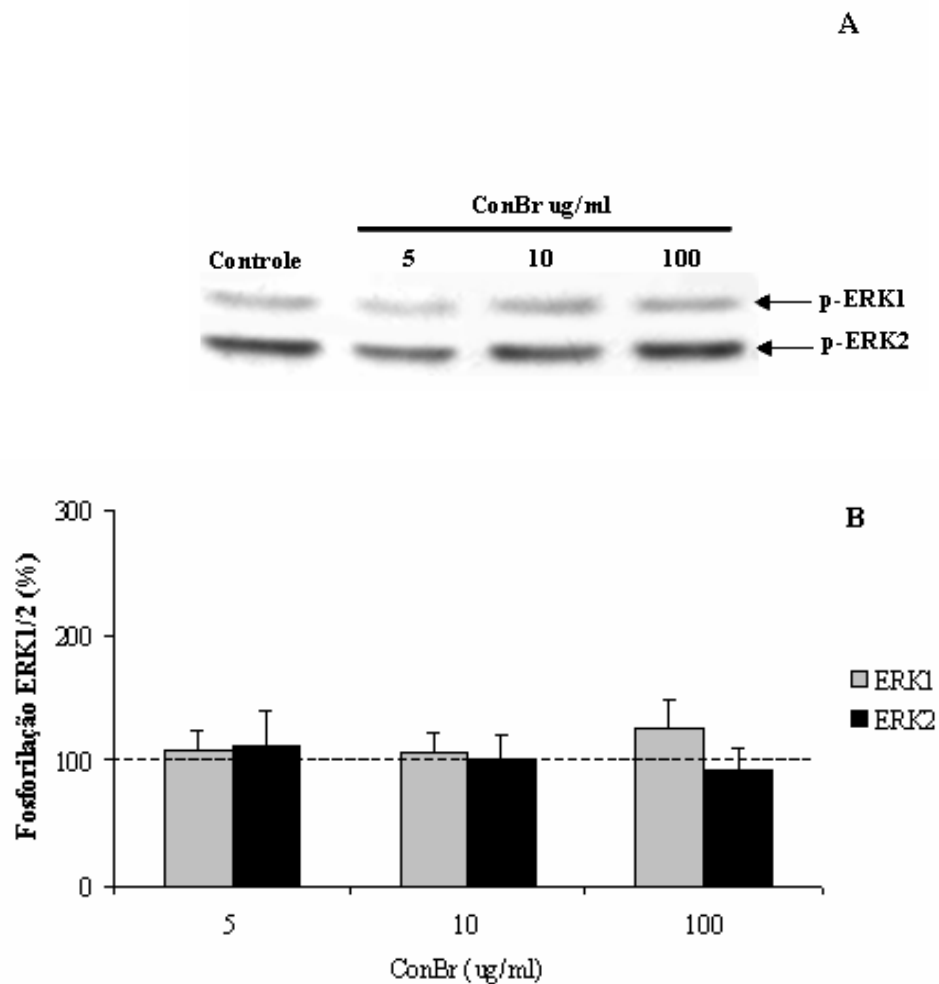


Figura 23 - Efeito de ConBr sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratas adultas em incubações de 5 minutos. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Quantificação da fosforilação das bandas. Fatias hipocampais foram incubadas com diferentes concentrações de ConBr durante 5 minutos. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 4$; $p > 0,05$, diferenças não significativas em relação ao controle.

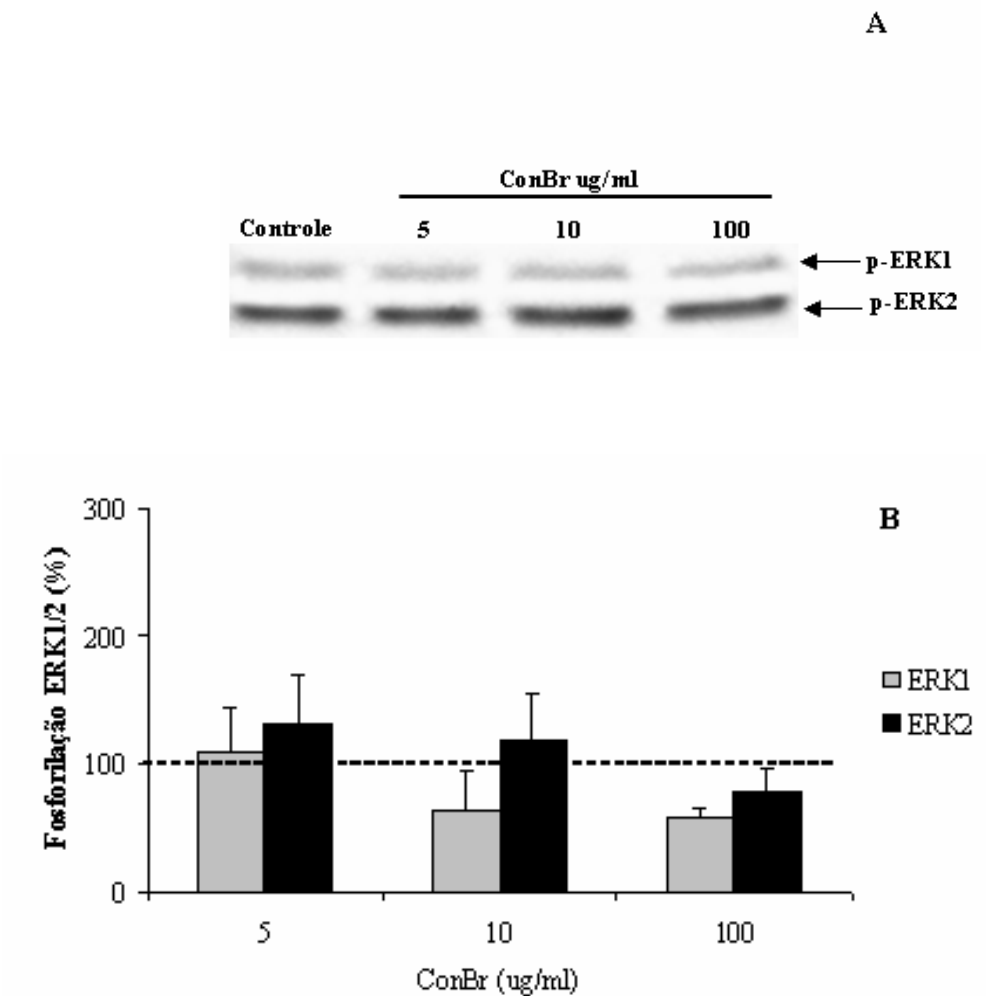


Figura 24 - Efeito de ConBr sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratas adultas em incubações de 30 minutos. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Quantificação da fosforilação das bandas. Fatias hipocampais foram incubadas com diferentes concentrações de ConBr durante 30 minutos. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 4$; $p > 0,05$, diferenças não significativas em relação ao controle.

4.3. ESTUDOS DOS EFEITOS DAS LECTINAS CONBR E CONA *IN VITRO* EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS C6 E U-937

4.3.1 - Análise da viabilidade de células C6 tratadas com ConBr e ConA

Vários estudos têm demonstrado que lectinas apresentam propriedades importantes na indução de morte de vários tipos de células, incluindo células de câncer (Park *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Koyama *et al.*, 2002; Abuharbeid *et al.*, 2004). Entretanto, nenhum trabalho publicado tem demonstrado a diminuição da proliferação de células de glioma C6 pelas lectinas ConBr e ConA.

Desta forma, foi determinado o efeito das lectinas ConBr e ConA sobre a viabilidade de células de glioma C6 através da avaliação da capacidade redutora do MTT. Células C6 foram encubadas durante 24, 48 e 72 horas, nas condições de cultivo (SFB 1%) com diferentes concentrações de ConBr e ConA (1, 10 e 100 µg/ml). Para controle as células foram incubadas apenas com meio de cultura (nas condições de cultivo). A viabilidade celular, capacidade redutora sobre o MTT, foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). As Figura 25 e 26 mostram os efeitos de ConBr e ConA, respectivamente, sobre a viabilidade das células C6. A lectina ConBr causou alteração significativa da viabilidade celular apenas na concentração de 100 µg/ml, nos períodos de incubação de 48 e 72 horas. ConA também apresentou diminuição significativa da proliferação celular na concentração de 100 µg/ml no período de incubação de 48 horas. Adicionalmente, ConA causou alteração da proliferação das células C6 em todas as concentrações utilizadas no período de incubação de 72 horas.

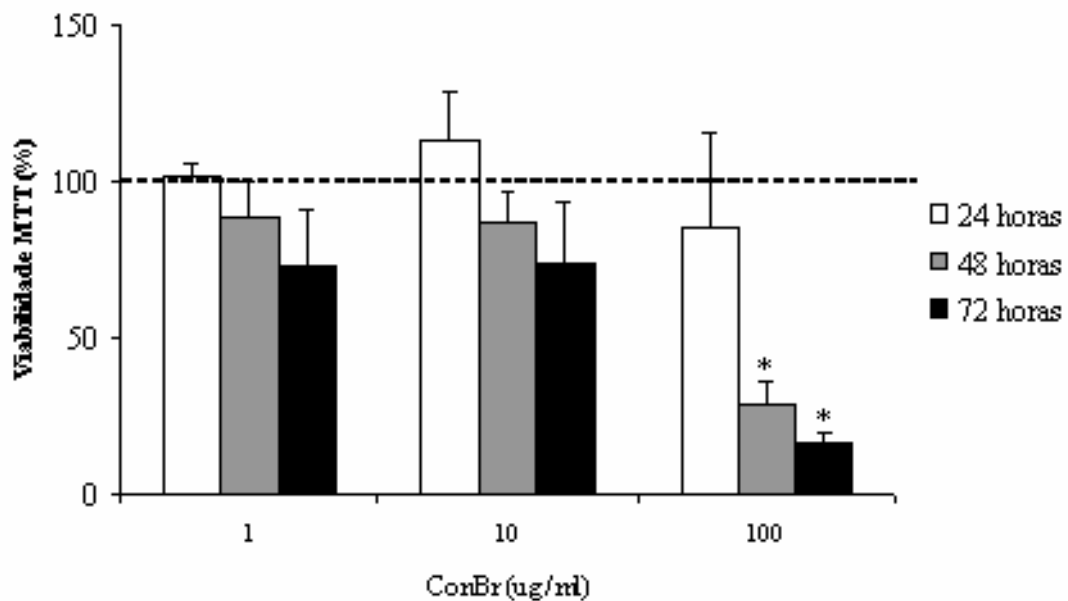


Figura 25 - Efeito da lectina ConBr na redução do MTT em células de glioma C6.

Células C6 foram incubadas com diferentes concentrações de ConBr por períodos de 24, 48 e 72 horas. As células controle foram incubadas apenas com meio em condições de cultivo (SFB 1%). A viabilidade foi determinada pela capacidade de redução do MTT. Resultados representam média \pm erro padrão e são expressos como percentuais do controle (considerado 100%). $n = 3$; * $p < 0,05$ resultados significativos em relação ao controle.

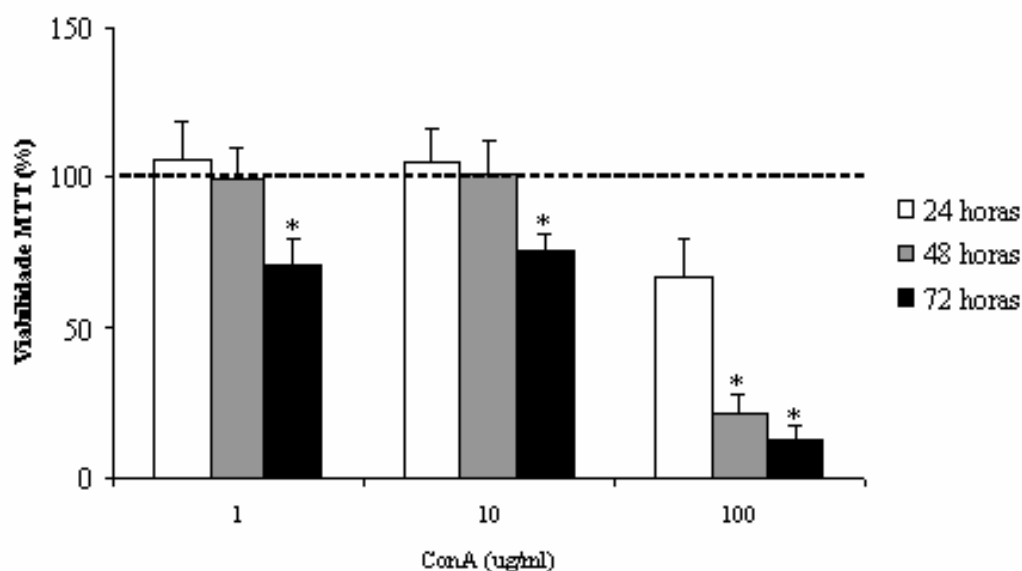


Figura 26 - Efeito da lectina ConA na redução do MTT em células de glioma C6.

Células C6 foram incubadas com diferentes concentrações de ConA por períodos de 24, 48 e 72 horas. Para controle células foram incubadas apenas com meio em condições de cultivo (SFB 1%). A viabilidade foi determinada pela capacidade de redução do MTT. Resultados representam média \pm erro padrão e são expressos como percentuais do controle (considerado 100%). n = 3; * p < 0,05 resultados significativos em relação ao controle.

4.3.2 - Análise da fosforilação de ERK1/2 em células C6 tratadas com ConBr e ConA.

Tem sido demonstrado que ERK1/2 estão geralmente envolvidas na resposta a fatores de crescimento (ex. PDGF, EGF), mediando proliferação e diferenciação celular (Chen *et al.*, 2001; Wang & Bonner, 2000), entre outras respostas.

Lectinas, proteínas que se ligam a resíduos de carboidratos, podem interagir com glicoproteínas de superfície celular que são expressas intensamente em células tumorais, podendo levar a mudanças significativas nas respostas relacionadas à transdução de sinais intracelulares (Park *et al.*, 2000).

Entretanto, nenhum estudo mostrou a modulação de ERK em células de glioma C6 tratadas com as lectinas ConBr ou ConA. Foi realizado um experimento para analisar a modulação de ERK1/2 em células C6 tratadas com ConBr e ConA em concentrações de 1, 10 e 100 µg/ml no período de 24 horas. As células controle foram incubadas apenas com meio de cultura (nas condições de cultivo). As figuras 27A e 28A mostram os imunoblottings representativos da fosforilação de ERK1/2 na células C6 tratadas com ConBr e ConA, respectivamente. As figuras 27B e 28B representam o imunoconteúdo de ERK1/2.

Por ter sido realizado somente um experimento, podemos apenas sugerir que ConBr e ConA podem estar diminuindo a fosforilação de ERK1/2 em células C6 de maneira dependente de dose, sendo necessário portanto, a repetição destes experimentos para posterior confirmação.

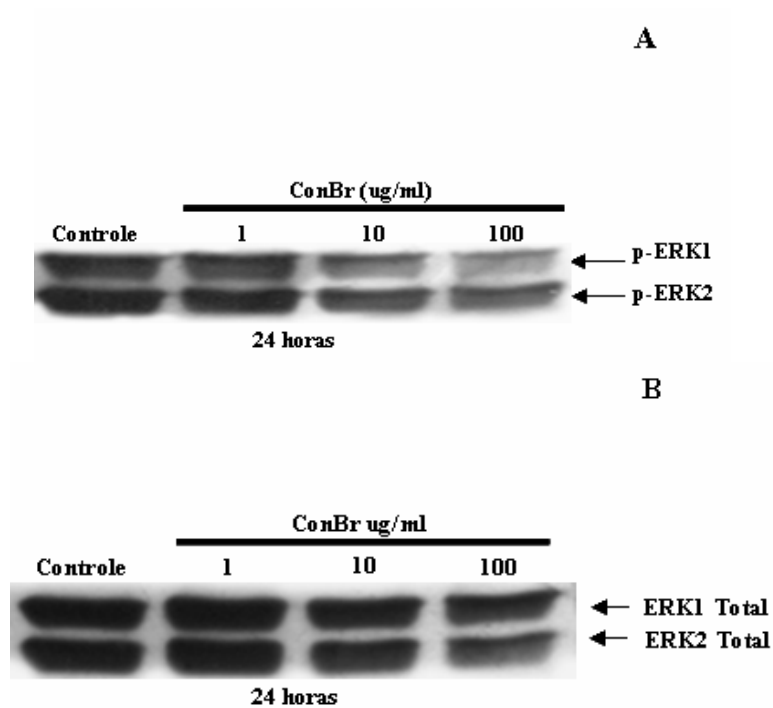


Figura 27 - Efeito de ConBr sobre a fosforilação de ERK1/2 em células C6 no período de incubação de 24 horas. (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Imunoconteúdo de ERK1/2. Células C6 foram incubadas com diferentes concentrações de ConBr durante 24 horas. Para controle células foram incubadas apenas com meio em condições de cultivo (SFB 1%). As figuras acima representam o resultado obtido em apenas um experimento.

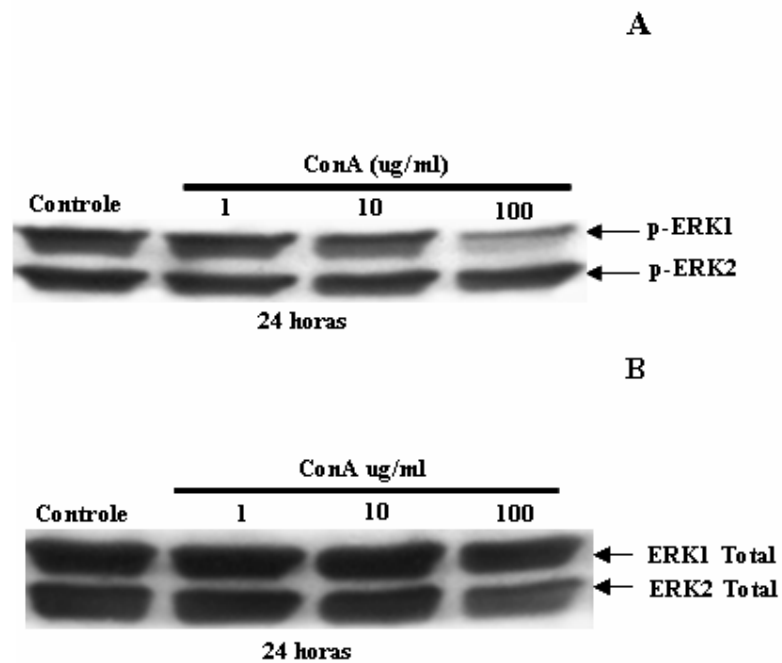


Figura 28 - Efeito de ConA sobre a fosforilação de ERK1/2 em células C6 no período de incubação de 24 horas. (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Imunoconteúdo de ERK1/2. Células C6 foram incubadas com diferentes concentrações de ConBr durante 24 horas. Para controle células foram incubadas apenas com meio em condições de cultivo (SFB 1%). As figuras acima representam o resultado obtido em apenas um experimento.

4.3.3 - Análise da viabilidade de células U-937 tratadas com ConBr

As células de leucemia monoblástica humana U-937 têm sido muito utilizadas no estudo de várias lectinas com propriedades anti-tumorais (Koyama *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003). Entretanto, nenhum trabalho tem demonstrado efeitos das lectinas ConBr e ConA na proliferação de células U-937.

O efeito da lectina ConBr sobre a viabilidade de células U-937 foi determinado através do método do MTT. As células foram incubadas durante 24 e 48 horas, nas condições de cultivo, na ausência ou na presença de SFB (5%) com diferentes concentrações de ConBr (0,5, 1, 5, 10, 30, 50 e 100 µg/ml). Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura (com ou sem soro 5%). A viabilidade celular, capacidade redutora sobre o MTT, foi expressa em percentagem do controle (considerado como 100%). As Figura 29 e 30 mostram os efeitos de ConBr sobre a viabilidade das células U-937 em 24 e 48 horas, respectivamente. A lectina ConBr causou uma redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 5 µg/ml nos períodos de incubação de 24 e 48 horas, na ausência de SFB e a partir de 10 µg/ml, na presença de SFB.

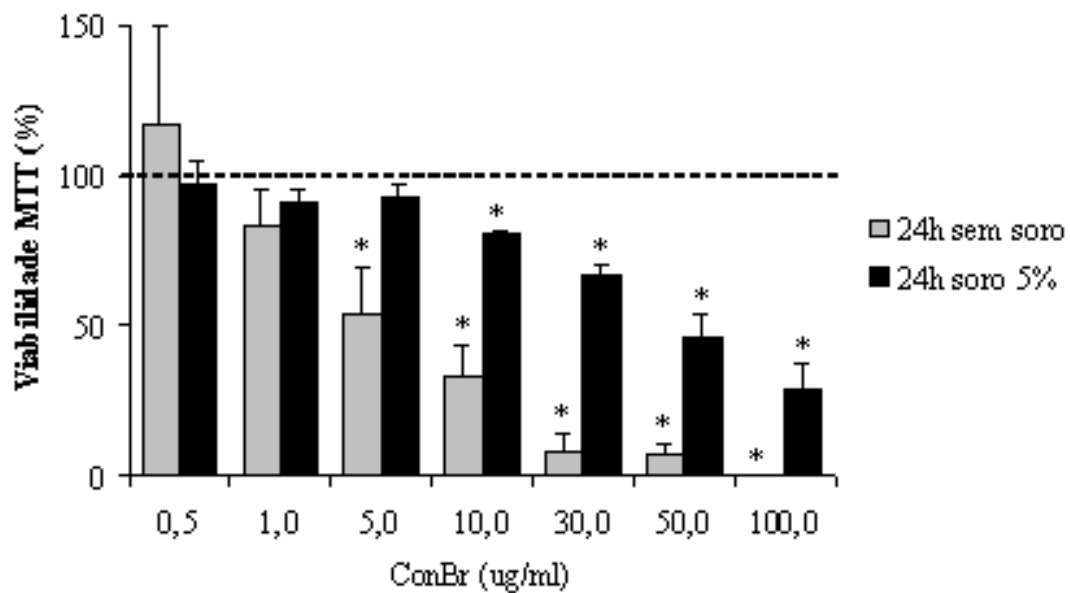


Figura 29 - Efeito de ConBr sobre a proliferação das células U-937 em 24 horas pelo método do MTT. Os resultados representam valores médios de 3 experimentos, processados em quadruplicata. Os resultados representam a média \pm erro padrão e são expressos como percentuais relativos ao controle (considerado 100%); * $p < 0,05$ em resultados significativos em relação ao controle.

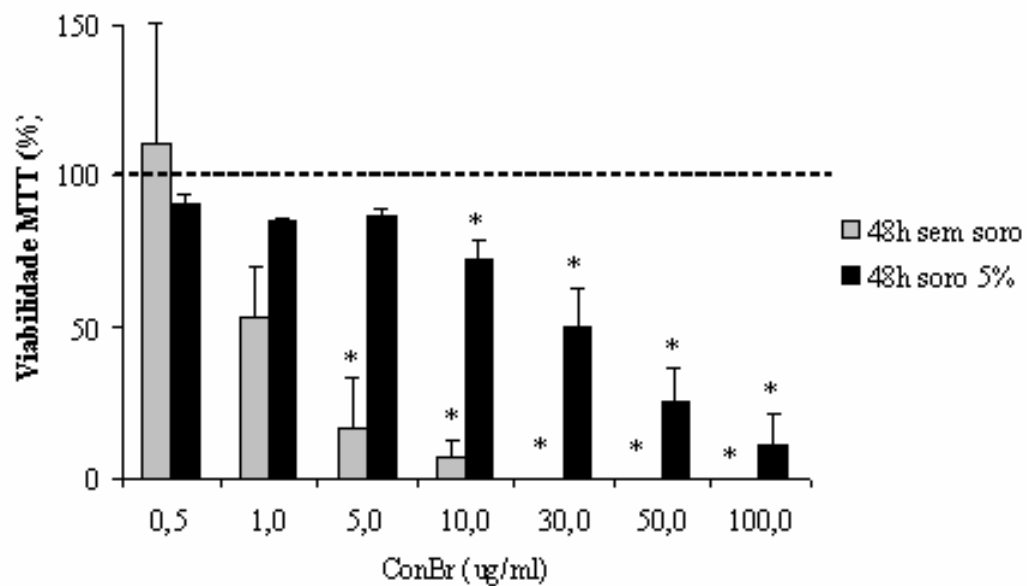


Figura 30 - Efeito de ConBr sobre a proliferação das células U-937 em 48 horas pelo método do MTT. Os resultados representam valores médios de 3 experimentos, processados em quadruplicata. Os resultados representam a média \pm erro padrão e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%); * $p < 0,05$ em resultados significativos em relação ao controle.

5-DISCUSSÃO

Como visto anteriormente, lectinas representam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, que apresentam a propriedade comum de se unir reversivelmente a carboidratos com alta especificidade (Cavada *et al.*, 2001). Os carboidratos agem como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos e podem desencadear fenômenos de diferenciação, proliferação e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas. Lectinas têm sido frequentemente utilizadas no estudo de diferentes sistemas biológicos, incluindo no sistema nervoso central (SNC) (Helmholz *et al.*, 2003; Partin *et al.*, 1993; Yue, *et al.*, 1995; Everts *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 1998; Lin & Levitan, 1991; Scherer & Udin, 1994). Porém, poucos trabalhos têm avaliado o papel de lectinas na liberação de neurotransmissores (Boehm & Huck, 1998; Grasso *et al.*, 1978). Um dos objetivos deste estudo foi avaliar possíveis ações das lectinas ConBr e ConA sobre preparações pré-sinápticas do sistema nervoso central.

A viabilidade dos sinaptossomas frente às lectinas foi analisada através do método que mede o nível de liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH). Esta enzima, quando liberada em grande quantidade no meio extra-sinaptossomal representa um possível dano ou ruptura da membrana. Os resultados apresentados neste trabalho (Figuras 9 e 10) demonstram que não houve alteração na liberação de LDH, relativo ao controle, durante os ensaios de liberação de glutamato. Isto indica que as lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia ensiformes* (ConA) não causaram ruptura da membrana sinaptossomal nos tempos e concentrações utilizados. Também foi observado que mesmo incubando os sinaptossomas durante 1 hora com as lectinas, estes não apresentaram modificação da liberação de LDH relativo ao controle (dados não mostrados).

Posteriormente, foram realizados experimentos onde a liberação de glutamato foi evocada por KCl na presença de ConBr (Figura 11). A lectina ConBr não alterou a liberação de L-[³H] glutamato induzida por KCl. Este resultado está de acordo com trabalhos que mostram que a liberação de outros neurotransmissores evocada por KCl, em diferentes modelos, não foi alterada por ConA (Grasso *et al.*, 1978). KCl 40 mM, utilizado como controle positivo de liberação, foi capaz de induzir a liberação de L-[³H] glutamato em sinaptossomas, mesmo na presença da maior concentração de ConBr utilizada (100 µg/ml). Porém, sinaptossomas tratados somente com as lectinas ConA e ConBr (Figuras 8 e 6, respectivamente), não mostraram alterações na liberação basal de L-[³H] glutamato. Portanto, nossos dados sugerem que a integridade funcional dos sinaptossomas não foi prejudicada na presença de ConBr e que as lectinas isoladamente não são capazes de alterar a taxa de liberação de L-[³H] glutamato basal ou dependente de despolarização.

Alguns estudos têm demonstrado que várias lectinas podem causar danos celulares induzindo apoptose, em diferentes tipos de células. Barbosa *et al.*, (2001) demonstraram que algumas lectinas Diocleinae, inclusive ConBr, apresentaram capacidade estimulatória de células T *in vivo* e foram capazes de induzir apoptose. Um outro trabalho demonstrou também, que a lectina ConA foi capaz de induzir apoptose em fibroblastos (Kulkarni *et al.*, 1998). Desta forma, embora existem evidências de efeitos citotóxicos de algumas lectinas em diferentes células, não foi possível observar danos provocados por ConBr e ConA no terminal sináptico destacado (sinaptossomas).

Tendo em vista que ConBr e ConA se ligam com especificidade a manose e glicose, e que a glicose presente no tampão Hepes-salina poderia estar inibindo as atividades das lectinas, foram realizados experimentos onde a liberação de glutamato foi realizada na ausência de glicose (Figura 7). A ausência de glicose não alterou o resultado obtido

anteriormente. Este resultado reforça a idéia de que as lectinas isoladamente não são capazes de estimular a liberação basal de L-[³H] glutamato na presença ou ausência de glicose.

A liberação de neurotransmissores das vesículas secretórias é um processo rápido, porém muito complexo. A disponibilidade e a mobilização das vesículas sinápticas são importantes parâmetros na regulação da transmissão sináptica. Uma vez que, para a vesícula sináptica se ancorar e se fundir com a membrana plasmática, são requeridas múltiplas interações proteína-proteína (Westerink, 2003). A localização de glicoproteínas presentes nas membranas sinaptossomais (Rossowska & Khachatrian, 1980) sugere que as lectinas podem apresentar ações relacionadas com a liberação de neurotransmissores como, por exemplo, no ciclo de “reciclagem” de vesículas sinápticas. Alguns estudos sugerem que glicoproteínas presentes nas membranas de vesículas sinápticas se incorporam temporariamente nas membranas plasmáticas durante a liberação de neurotransmissores (Goordon-Weeks & Jones, 1983).

Tem sido demonstrado que ConA inibe a liberação de transmissores evocada por α -latrotoxina em cultura primária de neurônios simpáticos (Boehm & Huck, 1998). α -Latrotoxina é uma neurotoxina que se liga a determinados receptores nos terminais nervosos, causando uma estimulação intensa da liberação de neurotransmissores por exocitose (Khvotchev & Südhof, 2000). As duas classes de receptores de α -latrotoxina, neurexina-Ia (dependente de cálcio) e latrofilina (independente de cálcio) são glicoproteínas e podem interagir com lectinas (Boehm & Huck, 1998).

O efeito inibitório da lectina ConA sobre a liberação de neurotransmissores, evocada por α -latrotoxina, envolve a união da lectina aos receptores glicoprotéicos desta toxina (Boehm & Huck, 1998).

Para avaliar possíveis ações de ConBr sobre a liberação de glutamato induzida por α -latrotoxina, foi utilizada a maior concentração de ConBr (100 $\mu\text{g/ml}$) e o maior tempo (5 minutos) de liberação utilizado nos experimentos anteriores. Os resultados obtidos neste trabalho (Figura 12) demonstram que a liberação de glutamato evocada por α -latrotoxina foi significativamente maior (30%) que o controle (21%), representando 43% de aumento em relação ao controle. A lectina ConBr por si só não alterou a liberação de L-[^3H] glutamato basal (23%), porém proporcionou um incremento de 20% no efeito de α -latrotoxina. Este resultado diverge da literatura, onde Boehm & Huck (1998) mostraram que ConA inibiu a liberação de [^3H] noradrenalina, evocada por α -latrotoxina, em cultura primária de neurônios simpáticos. Um aspecto que devemos relevar é que nosso estudo utilizou apenas o terminal sináptico e não neurônios em cultura, que pode implicar em diferenças importantes na expressão de glicoproteínas, por exemplo. Um outro aspecto importante é que lectinas da mesma família, apesar de terem alta homologia estrutural, podem apresentar diferentes efeitos biológicos (Cavada *et al.*, 2001). Como exemplo disto, Barral-Netto *et al.*, (1992) compararam a lectina ConA, conhecida como mitógeno de células T, com oito lectinas da mesma família, na estimulação da proliferação de linfócitos e produção de interferon γ por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de voluntários normais e demonstraram grandes variações na potência de lectinas com alta homologia.

Através dos resultados obtidos, é possível sugerir que a lectina ConBr pode ser utilizada como possível ferramenta em estudos de transmissão sináptica. Entretanto, para isso, serão necessários estudos adicionais no sentido de melhor caracterizar o seu alvo de ação no sinaptossoma.

Embora, não tenham sido determinados os mecanismos pelos quais a lectina ConBr aumentou a liberação de L-[^3H] glutamato evocada por α -latrotoxina, é possível sugerir que o

aumento da fosforilação de ERK1/2 observada nos sinaptossomas incubados com ConBr (Figuras 13, 14 e 15) possam estar envolvidos, pelo menos em parte, nesta ação de ConBr.

Sinapsinas são as proteínas de vesículas sinápticas mais abundantes e estão presentes em todos os terminais nervosos pré-sinápticos. A sinapsina prende pequenas vesículas sinápticas ao citoesqueleto de actina e possui sítios que podem ser fosforilados por várias proteínas quinases, incluindo MAPKs/ERKs. Esta fosforilação pode regular a interação de sinapsina com a liberação de neurotransmissores (Greengard et al., 1993; Jovanovic et al., 1996; Hilfiker et al., 1998). Adicionalmente, foi demonstrado que a ação de α -latrotoxina nos terminais nervosos está acoplada com alterações nos níveis de fosforilação das proteínas sinaptossomais, sinapsina I e sinaptotagmina (Pondnyakova *et al.*, 1996). Considerando que os receptores de α -latrotoxina podem ser alvos de lectinas e que ConBr pode causar aumento na fosforilação de ERK1/2 nos sinaptossomas, podemos especular que, alterações da fosforilação das proteínas sinaptossomais pelas ERKs, juntamente com possíveis alterações estimuladas por α -latrotoxina, possam estar cooperando para o incremento na liberação de glutamato induzida por α -latrotoxina, na presença da lectina ConBr.

Diversos receptores celulares e proteínas de matriz extracelular que modulam, direta ou indiretamente, as vias de sinalização dependentes de MAPKs são de natureza glicoprotéica, podendo portanto, ser alvo de ligações de lectinas (Tang *et al.*, 2000; Partin *et al.*, 1993; Yue, *et al.*, 1995; Everts *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 1998).

A via da ERK é conhecida por apresentar importante papel no crescimento e diferenciação celular. Recentemente, tem sido apontado um envolvimento em eventos de plasticidade sináptica, como o fenômeno de potenciação de longa duração (LTP), implicado na formação de memória (Sweatt, 2004; Thomas & Huganir, 2004). Além disso, ERK1/2 podem modular respostas sinápticas de curto prazo, assim como a liberação de

neurotransmissores (Orban *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2000). Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a ativação de ERK1/2 em modelos de sinaptossomas de ratas adultas em resposta ao tratamento com ConBr e KCl (Figuras 13, 14 e 15), mas não em resposta a ConA (Figuras 16, 17 e 18). Apesar de não ter sido encontrado trabalhos que mostrem a modulação da ativação de MAPK por lectinas em preparações do sistema nervoso central, Ohta *et al.*, (1992) demonstraram que ConA induz a fosforilação de tirosina em neutrófilos. Desta forma, é possível sugerir que, se as lectinas se ligam a resíduos de carboidratos nas superfícies dos receptores de membranas, elas poderiam estar promovendo a ativação de diversos receptores glicoprotéicos presentes na superfície sinaptossomal, e conseqüentemente poderia causar ativação da via de sinalização dependente de ERK. A ativação de ERK2 observada em resposta a despolarização por KCl 40 mM (2 minutos) (Figura 14), concorda com dados da literatura onde foi demonstrado aumento da fosforilação desta proteína em sinaptossomas hipocâmpais (Pereira *et al.*, 2002) incubados em condições similares às utilizadas em nosso trabalho.

As ERK1/2 são primariamente ativadas por fatores de crescimento, mas podem ser ativadas por diversos estímulos como citocinas, choque térmico, luz ultravioleta, isquemia, estresse oxidativo, entre outros (Ramesh *et al.*, 1999; Irving *et al.*, 2000; NG & Bogoyevitch, 2000). O mecanismo mais conhecido de ativação de ERK é através de receptores tirosina quinase. Nesses receptores, os ligantes, como os fatores de crescimento neural e epidermal, causam autofosforilação do receptor (em resíduos de tirosina) que então se liga à proteínas adaptadoras, como a Grb2 (proteína ligante de receptor de fator de crescimento 2). A Grb2 é uma molécula adaptadora que possui um domínio SH2 e dois domínios SH3. O domínio SH2 reconhece a tirosina fosforilada em certos receptores tirosina quinase, como o receptor de fator de crescimento epidermal, e ancora a Grb2 à essas proteínas. Os domínios SH3

interagem com SOS (“son of sevenless”), uma proteína trocadora de nucleotídeos da guanina. SOS estimula a liberação de GDP e subsequente ligação de GTP à Ras (proteína G de 21 kDa). Ras ligada ao GTP interage com Raf (uma serina/treonina quinase) que é translocada para a membrana plasmática, onde se torna ativa. Raf ativada fosforila MEK 1 e 2, que por sua vez, ativam as ERKs (Figura 4) (Cobb & Goldsmith, 1995; Wilsbacher *et al.*, 1999). Adicionalmente, a via das MAPKs também pode ser regulada pela PKC, que pode ativar diretamente a Raf-1 por fosforilação (Kolch *et al.*, 1993). A ativação de ERK depende da fosforilação nos resíduos treonina 183 e tirosina 185, sendo que a defosforilação de qualquer sítio por uma fosfatase inativa a enzima (Cobb & Goldsmith, 1995).

Tem sido demonstrado que é necessária a internalização de algumas lectinas, como ConA, para que ocorra alguns eventos como, por exemplo, a indução de apoptose (Koyama *et al.*, 2002). Desta maneira, por apresentar similaridade estrutural com ConA, a lectina ConBr pode também estar ativando alvos dentro da célula, como a cascata das MAPKs. Tem sido demonstrado que a ativação de um receptor acoplado a proteína G e o aumento da concentração intracelular de cálcio $[Ca^{2+}]_i$ em resposta a despolarização, no caso de KCl ou a estimulação do receptor de glutamato podem também induzir ativação de ERK por mecanismos que ainda estão sendo esclarecidos (Pereira *et al.*, 2000). Em contrapartida, a lectina ConA não alterou a fosforilação de ERK 1/2 nos tempos de incubação ou concentrações utilizadas. Mais uma vez, demonstrando diferentes efeitos biológicos relacionados à lectinas com alta homologia estrutural. ConBr e ConA podem se ligar a estruturas similares de carboidratos, expostos diferentemente em superfícies celulares, ativando assim populações distintas de células ou induzindo efeitos quantitativos variados na mesma célula (Cavada B.S. *et al.*, 2001). Esses são os primeiros resultados que mostram efeitos de ConBr sobre a fosforilação de ERK1/2 em preparações pré-sinápticas do sistema

nervoso central, e sugerem que estas lectinas podem apresentar importantes efeitos relacionados à via de sinalização de MAPK.

Apesar dos efeitos observados por ConBr sobre a modulação da fosforilação de ERK1/2, não foi possível observar alterações na fosforilação de JNK em sinaptossomas incubados com ConBr (Figuras 19, 20 e 21). Ativação de JNKs está associada muitas vezes com a produção de morte celular (Mielke & Herdegen, 2000). Entretanto, alguns estudos também apontam papéis importantes de JNK na plasticidade sináptica (Bevilaqua *et al.*, 2003). Não podemos deixar de mencionar que não foi detectado a presença da forma fosforilada (ativa) da proteína p38^{MAPK} em nosso modelo de sinaptossoma.

Tendo em vista, que a via das ERKs foi ativada por ConBr no modelo de sinaptossomas e que esta via participa de processos de aprendizado e memória dependente do hipocampo (Sweatt, 2004), bem como em processos de indução de LTP (Orban *et al.*, 1999; Sweatt, 2001) e LTD (Kawasaki *et al.*, 1999), tivemos como propósito avaliar possíveis alterações na fosforilação de ERK no modelo de fatias hipocampais.

Fatias representam um modelo que apresenta uma organização intacta e muito próxima das condições fisiológicas do SNC e tem sido muito utilizado no estudo de eventos de fosforilação protéica (Rodnight *et al.*, 1988; Leal *et al.*, 1997; Cordova *et al.*, 2004). Além disso, proteínas como fosfatases e quinases permanecem nas fatias, praticamente nas mesmas condições do cérebro (Rodnight *et al.*, 1988; Leal *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 2001). Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que as lectinas estudadas não alteraram a viabilidade das fatias hipocampais, que foi medida através da redução do MTT, em incubações de até 30 minutos (Figura 22). Também não foi observado alterações da fosforilação de ERK1/2 nas condições utilizadas (Figuras 23 e 24). Estes resultados podem ser explicados pelo fato das fatias apresentarem uma organização do tecido nervoso, onde o

acesso a proteínas multiméricas como lectinas em pH fisiológico, seja difícil, incluindo a presença de estruturas pré e pós-sinápticas, neurônios, astrócitos entre outras células, e matriz extracelular. Por outro lado, não pode ser descartada a possibilidade de que para fatias sejam necessários períodos de incubações mais longos. Apesar desta consideração, foi observado que mesmo em períodos de incubação de uma hora com ConBr, não foi observado alterações na fosforilação de ERK e p38^{MAPK} (dados não mostrados).

Finalmente, foram analisados os efeitos das lectinas ConBr e ConA sobre células tumorais. Considerando que várias lectinas têm sido utilizadas como agentes terapêuticos contra câncer, e que não existem trabalhos publicados que mostrem os efeitos de ConA e ConBr sobre a viabilidade e sinalização das células de glioma C6, foi realizado este estudo com intuito de contribuir para a literatura já existente. Além disso, vários trabalhos utilizam como modelo as células de leucemia U-937 (Koyama *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003). Desta forma, foi observado neste estudo, o efeito de ConBr sobre a viabilidade destas células, de forma a comparar com a literatura existente.

Os resultados mostraram que as lectinas ConBr e ConA diminuíram a viabilidade, medida através da capacidade de redução do MTT, das células de glioma C6 (Figuras 25 e 26, respectivamente). A lectina ConBr na maior concentração utilizada (100 µg/ml) causou uma diminuição significativa da viabilidade celular para menos de 30% daquela observada no controle (100%). No período de 72 horas, nesta mesma concentração a viabilidade caiu mais ainda, permanecendo em cerca de 17% em relação ao observado no controle. Estes dados indicam que a lectina ConBr causou redução significativa da viabilidade de células C6 de maneira dependente de dose e de tempo. Foi observado uma diminuição ainda mais acentuada da viabilidade celular causada por ConA. No período de incubação de 48 horas a maior concentração utilizada (100 µg/ml) diminuiu consideravelmente a viabilidade das células para

22% do observado no controle. No período de 72 horas de incubação todas as concentrações de ConA utilizadas causaram redução de viabilidade. Isto não ocorreu com ConBr, onde nestas mesmas condições somente as concentrações mais elevadas causaram a redução da viabilidade. Com estes dados é possível sugerir que ConA apresentou um maior efeito sobre a diminuição de viabilidade, medida através da redução de MTT, das células de glioma C6 em relação à ConBr.

Tendo em vista que, as MAPKs regulam diversas atividades, incluindo diferenciação, proliferação (Chang & Karin, 2001) e transformação celular (Neill & Kolch, 2004), respostas de estresse (Cowan & Storey, 2003), alteração morfológica e apoptose (Park et al., 2000), buscamos analisar prováveis efeitos de ConBr e ConA em alterações na fosforilação de ERK em células C6. Nossos dados representam uma diminuição aparente da fosforilação de ERK1/2 em células C6 tratadas com as lectinas ConBr e ConA (Figuras 27 e 28). Por ter sido feito apenas um experimento demonstrativo, será de crucial importância a realização de novos experimentos para confirmação e posterior esclarecimentos destes dados.

Para obtermos uma confirmação em relação aos dados obtidos na literatura, analisamos a viabilidade de células U-937 na presença de ConBr. Os resultados deste trabalho demonstraram que a lectina ConBr diminuiu consideravelmente a proliferação de células mieloleucêmicas U-937 (Figuras 29 e 30). Foi observado que a partir da dose de 5 µg/ml de ConBr, a viabilidade celular foi diminuída em incubações livre de SFB, nos dois tempos utilizados (24 e 48 horas). Entretanto, na presença de 5% de SFB, a diminuição da viabilidade foi observada a partir de 10 µg/ml.

Através destes resultados podemos sugerir que as lectinas ConBr e ConA tiveram participação efetiva na diminuição da viabilidade celular das células tumorais C6, com provável alteração da via de MAPK (ERKs), no caso das células de glioma C6.

Adicionalmente, verificamos uma grande similaridade sobre a viabilidade das células U937 frente à ConBr.

As lectinas ConA e ConBr têm apresentado diferentes efeitos biológicos em vários tipos de células relacionados a propagação de macrófagos peritoneais em camundongos (Rodriguez *et al.*, 1992), estimulação de linfócitos humanos *in vitro* (Barral-Netto *et al.*, 1992) ativação de linfócitos e apoptose (Barbosa *et al.*, 2001), bem como a indução de apoptose em macrófagos de camundongos (Suen *et al.*, 2000). No que se refere a ação de lectinas em modelos de células neurais, foi demonstrado por nosso grupo, em estudos preliminares, modificações morfológicas de astrócitos em cultura, frente a baixas concentrações de ConBr e morte destas células em concentração alta (100 µg/ml) (Dal Paz *et al.*, 2003). Desta forma, podemos sugerir que a ação de ConBr na diminuição da viabilidade celular possa ocorrer tanto em linhagens tumorais de glioma como em astrócitos.

Tem sido demonstrado que, lectinas de cogumelos (KL-15) (Kurokawa-15KDa) causaram uma diminuição da viabilidade em células U-937. Koyama *et al.*, (2002), observaram que esta diminuição da viabilidade esta diretamente relacionada com morte apoptótica. Estas células quando incubadas com lectinas KL-15 apresentaram sinais de apoptose como, formação de corpos apoptóticos, condensação da cromatina e fragmentação de DNA. Foi demonstrado também que a lectina II de *Viscum album* induz apoptose em células mieloleucêmicas humanas U-937 (Park *et al.*, 2000). Outros trabalhos relataram que estas lectinas ativam caspases, incluindo a caspase 8 (Bantel *et al.*, 1999). O mesmo grupo demonstrou que esta morte celular apoptótica está diretamente relacionada com ativação de JNK e clivagem da proteína quinase C (PKC) (Kim *et al.*, 2001). Recentemente, foi demonstrado que a lectina II desta planta apresentou potentes efeitos na indução de substâncias pró-oxidantes intracelulares em células U-937, promovendo um aumento na

geração de H_2O_2 intracelular e consequentemente podendo levar a produção de estresse oxidativo e morte celular apoptótica (Kim *et al.*, 2003).

Shumacker *et al.*, (2000), demonstraram que lectinas recombinantes de *Viscum album* apresentaram sucesso no tratamento de células de câncer de ovário humano. Também foi relatado que, uma lectina animal, galectina-1, induziu apoptose em células T (Perillo *et al.*, 1995). Apesar destas evidências, não estão bem esclarecidos os mecanismos que envolvem a morte celular destas células.

Ao contrário de nossos resultados em células de glioma C6, tem sido mostrado que Viscumina recombinante (lectina de *Viscum album* recombinante), proteína inativadora de ribossomo do tipo II, pode causar ativação de alguns membros da família das MAPK como ERK 1/2, JNK e $p38^{MAPK}$, em células de tumor SKOV-3 (Abuharbeid *et al.*, 2004).

Tendo em vista as diversas atividades provocadas por diferentes lectinas em diferentes tipos de células, e a importância da descoberta de novos e eficientes agentes anti-tumorais, é de crucial importância tentar estabelecer os mecanismos envolvidos nas ações de lectinas ConBr e ConA sobre células tumorais e sobre células “normais” (astrócitos, neurônios e microglia) do SNC. Apesar de termos encontrado fortes evidências dos danos causados por ConBr e ConA em células tumorais, não podemos deixar de considerar as possíveis alterações morfológicas encontradas em cultura primária de astrócitos na presença da lectina ConBr (Dal Paz *et al.*, 2003).

A realização deste trabalho possibilitou ao nosso grupo estudar de forma inédita as ações de lectinas em preparações do sistema nervoso central, na modulação de MAPKs e em células tumorais. Desta forma, abrindo novos caminhos e idéias para a realização de diversos estudos posteriores.

6-CONCLUSÕES

O presente trabalho nos permite concluir que:

- ConBr e ConA não alteraram a liberação basal de L-[³H] glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratas adultas.
- A lectina ConBr não alterou a liberação de L-[³H] glutamato estimulada por KCl 40 mM, indicando que a integridade funcional dos sinaptossomas não foi alterada na presença desta lectina.
- ConBr provocou um incremento significativo de 20% na liberação de L-[³H] glutamato evocada por α -latrotoxina.
- A lectina ConBr foi capaz de induzir a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas, mas não a fosforilação de JNK1/2, sugerindo que possíveis alvos de lectinas na membrana sinaptossomal podem estar ativando a cascata de ERKs.
- A lectina ConA não foi capaz de induzir a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas, demonstrando resultados diferentes entre lectinas com similaridade estrutural.
- ConBr não induziu a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo.
- A viabilidade sinaptossomal, medida através da liberação de LDH, e das fatias de hipocampo, medidas pela redução do MTT, não foi alterada nos tratamentos com as lectinas ConA e ConBr.
- A viabilidade das células de glioma C6 foi diminuída na presença das lectinas ConBr e ConA e a viabilidade das células mieloleucêmicas U937 na presença de ConBr. Isto sugere um efeito na diminuição da proliferação e/ou produção de morte celular.
- ConA apresentou um maior efeito sobre a diminuição de viabilidade, medida através da redução de MTT, das células de glioma C6 em relação à ConBr.

- Uma provável diminuição na fosforilação de ERK1/2 foi observada em células C6 incubadas com as lectinas ConA e ConBr.
- As lectinas ConA e ConBr apresentaram neste trabalho, variações em seus efeitos biológicos, apesar da alta homologia estrutural.

PERSPECTIVAS

O presente trabalho deixou algumas interrogações que podem ser utilizadas como sugestões para o desenvolvimento de novas pesquisas:

- Utilizar inibidores de MAPKs em modelos de liberação de glutamato evocada por α -latrotoxina na presença de ConBr;
- Utilizar inibidores das próprias lectinas (açúcares específicos), no intuito de confirmar suas ações;
- Determinar as ações de ConA no modelo de liberação de glutamato evocada por α -latrotoxina utilizado neste trabalho, a fim de obter uma comparação com os efeitos promovidos por ConBr.
- Promover ensaios de liberação na presença ou ausência de cálcio, a fim de determinar a participação deste íon frente a α -latrotoxina e a lectina ConBr.
- Avaliar a ocorrência de morte celular e/ou inibição da proliferação ocorrida nas células C6 e U937 frente às lectinas;
- Avaliar possíveis participações de outras MAPKs, como JNK e p38^{MAPK} na morte celular ou na diminuição da proliferação de células tumorais, frente às lectinas;
- Realizar ensaios com inibidores específicos de MAPKs em células tumorais na presença de ConA e ConBr.
- Analisar ações destas lectinas em células normais do SNC como astrócitos e neurônios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuharbeid, S.; Apel, J.; Sander, M.; Fiedler, B.; Langer, M.; Zuzarte, M.L.; Czubyko, F.; Aigner, A. Cytotoxicity of the novel anti-cancer drug rViscumin depends on Her-2 levels in SKOV-3 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 321, p. 403-412, 2004.
- Adams, M.E. & Swanson, G. **Trends Neurosci.** (Neurotoxins Supplement). Elsevier, Cambridge, 1996.
- Andrade, J.L.; Arruda, S.; Barbosa, T.; Paim, L.; Ramos, M.V.; Cavada, B.S.; Barral-Netto, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v 194, p.98-102, 1999.
- Baldo, B.A. Protein blotting: research, applications and its place in protein separation methodology In: **Advances in Electrophoresis**, ed. by A. Chranbach, M.J. Dunn and B.J. Radola, v 7, p.407-478, 1994.
- Bantel, H.; Engels, I.H.; Voelter, W.; Schulzeosthoff, K.; Wesselborg, S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signalling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. **Cancer Res.**, v 59, p. 2083-2090, 1999.
- Barbosa, T.; Arruda, S.; Cavada, B.S.; Grangeiro, T.B.; Freitas, L.A.R.; Barral-Netto, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v 96, p.673-678, 2001.
- Barral-Netto, M.; Santos, S.B.; Barral, A.; Moreira, L.I.M.; Santos, C.F.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S. Human lymphocyte by legume lectins from the Diocleinae tribe. **Immunological Investigations**, v 21(4), p. 297-303, 1992.
- Bear, M.F.; Connors, B.W.; Paradiso, M.A. **Neurociências: Explorando o Cérebro**, Artmed, Curitiba, 2002.
- Bento, C.A.; Cavada, B.S.; Oliveira, J.T.; Moreira, R.A.; Barja-Fidalgo, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents Actions**, v 38, p.48-54, 1993.
- Bevilaqua, L.R.M.; Sokeno, D.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. **European Journal of Neuroscience**, v 17, p. 897-902, 2003.
- Bobrovskaja, L.; Odell, A.; Leal, R.B.; Dunkley, P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. **Journal of Neurochemistry**, v 78, p.490-498, 2001.
- Boehm, S. & Huck, S. Presynaptic inhibition by concavalin A: Are α -latrotoxin receptors involved in action potential – dependent transmitter release?. **Journal of Neurochemistry**.v 71, p.2421 – 2430, 1998.

- Breukel, A.I.M.; Besselsen, E.; Ghijsen, W.E.J.M. Synaptosomes: a model system to study release of multiple classes of neurotransmitters. In: Rayne, R.C. (ed). **Methods in molecular biology**, v 72, p. 33-47, 1997.
- Calvete, J.J.; Thole, H.H.; Raida, M.; Urbanke, C.; Romero, A.; Grangeiro, T.B.; Ramos, M.V.; Rocha, I.M.A.; Guimarães, F.N.; Cavada, B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v 1430, p. 367-375, 1999.
- Cavada, B.S.; Moreira-Silva, L.I.M.; Grangeiro, T.B.; Santos, C.F.; Pinto, V.P.T.; Barral-Netto, M.; Roque-Barreira, M.C.; Gomes, J.C.; Martins, J.L.; Oliveira, J.T.A.; Moreira, R.A. Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. Seeds. (Van Driessche, E.; Fisher, J.; Beeckmans, S.; Bog-Hansen, T.C.; eds), p. 74-80, Textop, Denmark, 1996.
- Cavada, B.S.; Barbosa, T.; Arruda, S.; Grangeiro, T.B.; Barral-Netto, M. Revisiting *proteus*: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptides Science**, v 2, p. 1-13, 2001.
- Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v 410, n.1, p.37-40, 2001.
- Chen, Z.; Gibson, I.B.; Robinson, F.; Silvestro, L.; Pearson, G.; Xu, B.; Wright, A.; Vanderbitt, C.; Cobb, M.H. MAP Kinases. **Chem Rev**, v 101, p. 2449-2476, 2001.
- Cobb, M.H. & Goldsmith, E.J. How the Map kinases are regulated. **The Journal of Biological Chemistry**, v 270, n.25, p.14843-14846, 1995.
- Collins, E. & Sim, A.T.R. Regulation of neuronal PP1 and PP2A during development. **Methods in Molecular Biology**, v 93, p.79-102, 1998.
- Cordova, F.M.; Rodrigues, A.L.S.; Giacomelli, M.B.O.; Oliveira, C.S.; Posser, T.; Dunkley, P.R.; Leal, R.B. Lead stimulates ERK1/2 and p38^{MAPK} phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Research**, v 998, p.65-72, 2004.
- Cowan, K.J. & Storey, K.B. Mitogen activated protein kinases: new signalling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **The Journal of Experimental Biology**, v 206, p. 1107-1115, 2003.
- Dal Paz, K.; Pereira, S.F.; Batista, P.A.; König, S.; Moura-Netto, V.; Pinto, V.P.T.; Teixeira, E.H.; Cavada, B.S.; Leal, R.B. Effects of the ConBr lectin on cell viability, morphology and modulation of MAPKs in preparations of CNS tissue. **Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, p. 223, 2003.
- Dolmetsch, R.E.; Pajvani, U.; Fife, K.; Spotts, J.M.; Greenberg, M.E. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channels calmodulin complex through the MAP Kinase pathway. **Science**, v 294, p. 333-339, 2001.

- Dunkley, P. R.; Heath, J. W.; Harrison, S. M.; Jarvie, P. E.; Glenfield, P. J.; Rostas, J. A. P. A rapid percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. **Brain Research**, v 441, p. 59-71, 1988.
- Enomoto, A.; Suzuki, N.; Morita, A.; Niko, M.I.; Liu, C.Q.; Matsumoto, Y.; Yoshioka, K.; Shiba, T.; Hosoi, Y. Caspase-mediated cleavage of JNK during stress-induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 306, p. 837-842, 2003.
- Everts, I.; Villmann, C.; Hollmann, M. N-glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. **Molecular Pharmacology**, v 52, p.861-873, 1997.
- Gasic, G. P.; & Hollman, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annu. Rev. Physiol.**, v 54, p. 507-536, 1994.
- Gomes, J.C.; Ferreira, R.R., Cavada, B.S., Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v 41, p. 132-135, 1994.
- Gong, C.; Lidsky, T.; Wegiel, J.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. **Brain Research Protocols**. v.6, p.134-140, 2001.
- Gordon-Weeks, P.R. & Jones, D.H. Binding and uptake of concanavalin A into rat brain synaptosomes: evidence for synaptic vesicle recycling. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v 219 (1217), p. 413-422, 1983.
- Grangeiro, T.B.; Schriefer, A.; Calvete, J.J.; Raida, M.; Urbanke, C.; Barral-Netto, M.; Cavada, B.S. **Eur J Biochem**, v248, p. 43-48, 1997.
- Grasso, A.; Rufini, S.; Senni, I. Concanavalin A blocks black widow spider toxin stimulation of transmitter release from synaptosomes. **Fedn Eur Biochem Socs Lett**, v 85, p.241-244, 1978.
- Greengard, P.; Valtorta, F.; Czernik, A.J. Benfenati, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science**. v 259, p.780-785, 1993
- Greengard, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**, v 294, p.1024-1030, 2001.
- Gunjii, H.; Kharbanda, S.; Kufe, D. Induction of internucleosomal DNA fragmentation in myeloid leukemia cells by 1-beta-D-arabinofuranosyl-cytosine. **Cancer Res.**, v 51, p. 741-743 (1991).
- Gutman, Y. & Lazarovici, P. Cellular & Molecular Mechanisms of Toxin Action. **Toxins and Signal Transduction**, v. 1, pp.501, 1997.

- Hasegawa, N.; Kimura, Y.; Oda, T.; Komatsu, N.; Muramatsu, T. Isolated ricin B-chain-mediated apoptosis in U937 cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v 64, p. 1422-1429, 2000.
- Helmholz H.; Cartellieri S.; He L.; Thiesen P.; Niemeyer B. Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. **Journal of Chromatography A**, v 1006, p.127-135, 2003.
- Hensley, K.; Robinson, K.A.; Pye, Q.N.; Floyd, R.A.; Cheng, I.; Garland, W.A.; Irwin, I. CPI-1189 inhibits interleukin 1 β -induced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation: an explanation for its neuroprotective properties? **Neuroscience Letters**. v.281, p.179-182, 2000.
- Hilfiker, S.; Schweizer, F.E.; Kao, H-T.K.; Czernik, A.J.; Greengard, P.; Augustine, G.J. Two sites of action for synapsin domain B in regulating neurotransmitter release. **Nature Neuroscience**, v 1, p.29-35, 1998.
- Hoffman, K.B.; Kessler, M.; Ta, J.; Lam, L.; Lynch, G. Mannose-specific lectins modulate ligand binding to AMPA-type glutamate receptors. **Brain Res.**, v 795, p.105-111, 1998.
- Holz, R.W. & Fischer, S.K. Synaptic transmission and cellular signalling: an overview. In: **Basic Neurochemistry**. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 1999.
- Huettner, J.E. Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: Activation by kainite and quisqualate and blockade of desensitization by ConA. **Neuron**, v 5, p.255-266, 1990.
- Hunter, T. & Sefton, B.M. Protein phosphorylation. Part A. **Methods in Enzymology**. v.200, 1991.
- Irving, E.A.; Barone, F.C.; Reith, A.D.; Hadingham, S.J.; Parsons, A.A. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. **Molecular Brain Research**, v 77, p.65-75, 2000.
- Kawasaki, H.; Morooka, T.; Shimohama, S.; Kimura, J.; Hirano, T.; Gotoh, Y.; Nishida, E. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. **Journal of Biological Chemistry**, v 272, p.18518-18521, 1997.
- Khvotchev, M.; Südhof, T.C. α -latrotoxin triggers transmitters release via direct insertion into the presynaptic plasma membrane. **The European Molecular Biology Organization**, v 19, p. 3250-3262, 2000.
- Kim, M.S.; So, H.S.; Lee, K.M.; Park, J.S.; Lee, J.H.; Moon, S.K.; Ryu, D.G.; Chung, S.Y.; Jung, B.H.; Kim, Y.K.; Moon, G.; Park, R. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **General Pharmacology**, v 34, p. 349-355, 2000.
- Kim, S.K.; Lee, J.; Lee, So, H.S.; Jung, B.H.; Chung, S.Y.; Moon, S.R.; Kim, N.S.; Ko, C.B.; Kim, H.J. Kim, Y.K., Park, R. Gamma-Interferon (IFN- γ) augments apoptotic response to mistletoe lectin-II via upregulation of Fas/Fas L expression and caspase

- activation in human myeloid U937 cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v 23, p. 55-66, 2001.
- Kim, S.K.; Lee, J.; Lee, K.M.; Yang, S.H.; Choi, S.; Chung, S.Y.; Kim, T.Y.; Jeong, W.H.; Park, R. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. **Life Sciences**, v 73, p. 1231-1243, 2003.
- Kolch, W.; Heidecker, G.; Kochs, G.; Hummel, R.; Vahidi, H.; Mischak, H.; Finkenzeller, G.; Marmé, D.; Rapp, U.R. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. **Nature**, v.364, n.6434, p.249-252, 1993.
- Koyama Y.; Katsuno Y.; Miyoshi N.; Hayakawa S.; Mita T. Apoptosis Induction by Lectin Isolated from the Mushroom *Boletopsis leucomelas* in U-937 Cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v 6 (4), p. 784-789, 2002.
- Krasnoperov, V.G.; Bittner, M.A.; Beavis, R.; Kuang, Y.; Salnikow, K.V.; Chepurny, O.G.; Little, A.R.; Plotnikov, A.N.; Wu, D.; Holz, R.W.; Petrenko, A.G. α -Latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor. **Neuron**, v 18, p. 925-937, 1997.
- Kulkarni, G.V.; Lee, W.; Seth, A.; McCulloch, C.A.G. Role of mitochondrial membrane potencial in Concanavalin A-induced apoptosis in human fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v 245, p. 170-178, 1998.
- Jovanovic, J.N.; Benfenati, F.; Siow, Y.L.; Sihra, T.S.; Sanghera, J.S.; Pelech, S.L.; Greengard, P.; Czernik, A.J. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. **Neurobiology**, v 93, p.3679-3683, 1996.
- Lazarovici, P. & Lelkes, P.I. Pardaxin induces exocytosis in bovine adrenal medullary chromaffin cells independent of calcium. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v 263, p. 1317-1326, 1992).
- Leal, R.B.; Gonçalves, C.A.; Rodnight, R. Calcium-dependent phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the rat hippocampus: a comparison of the kinase/phosphatase balance in immature and mature slices using tryptic phosphopeptide mapping. **Developmental Brain Research**, v 104, p. 1-10, 1997.
- Leal, R.B.; Sim, A.T.R.; Gonçalves, C.A.S.; Dunkley, P.R. Tyrosine hydroxylase dephosphorylation by protein phosphatase 2A in bovine adrenal chromaffin cells. **Neurochemical Research**, v 27, p. 207-213, 2002a.
- Leal, R.B.; Cordova, F.M.; Lynn, H.; Bobrovskaya, L.; Dunkley, P.R. Lead-stimulate p38^{MAPK}-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v 178, p.44-51, 2002b.
- Lee, S.A.; Park, J.K.; Kang, E.K.; Bae, H.R.; Bae, K.W.; Park, H.T. Calmodulin-dependent activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases contributes to *c-fos* expression by calcium in PC12 cells: modulation by oxide nitric. **Molecular Brain Research**, v 75, p.16-24, 2000.

- Leenders, A.G.M. & Sheng, Z.H. Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: implications for presynaptic plasticity. *Pharmacology & Therapeutics*, v105, p. 69-84, 2005.
- Lent, R. **Cem bilhões de neurônios**. Editora Atheneu, São Paulo, 2001.
- Liang, S.; Woodlock, T.J.; Whitin, J.C.; Lichtman, M.A.; Segel, G.B. Signal transduction in N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and Concanavalin A stimulated human neutrophils: superoxide production without a rise in intracellular free calcium. *J. Cellular Physiology*, v 145, p.295-302, 1990.
- Lin, S. S. & Levitan, I.B. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. *Trends Neuroscience*, v 14, p.273 – 277, 1991.
- Lineal, M.; Grasso, A.; Lazarovici, P. Cellular & Molecular Mechanisms of Toxin Action, vol 2: **Secretory systems and toxins**. Harwood Academic Publishers. p.476, 1998.
- Lis, H.; Sharon, N. Lectins as molecules and a tools. *Rev. Biochem*, v 55, p. 35, 1986.
- Liu, Y.; Peterson, D.A.; Kimura, H. Schubert, D. Mechanism of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, v 69, p.581-593, 1997.
- Mathers, B.A. & Usherwood, P.N.R. Concanavalin A blocks desensitization of glutamate receptors on insect muscle fibers. *Nature*, v 259, p.409.
- McBain, C.J. & Mayer, M.L. N-metil-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol rev*, v 74, p. 723.
- Mc-Donald, J.W. & Johnston, M.V.; Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research Reviews*, v 15, p. 41-70, 1990.
- Martin-Blanco, E. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *BioEssays*, v 22, p.637-645, 2000
- Meldolesi, J. Studies on α -latrotoxin receptors in rat brain synaptosomes: correlation between toxin binding and stimulation of transmitter release. *J Neurochem*, v 38, p. 1559-1569, 1982.
- Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *American Society for Nutritional Sciences*., v 130, p. 1007S-1015S, 2000.
- Migues, P.V.; Leal, R.B.; Mantovani, M.; Nicolau, M.; & Gabilan, N. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *NeuroReport*, v 10, p. 67-70, 1999.
- Mielke, K. & Herdegen, T. JNK and p38 stresskinases – degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, v 61, p.45-60, 2000.

- Miyoshi, N.; Koyama, Y.; Katsuno, Y.; Hayakawa S.; Mita, T. Apoptosis Induction Associated with Cell Cycle Dysregulation by Rice Bran Agglutinin ¹. **J. Biochem.**, v 130, p.799-805, 2001.
- Mizukami, Y.; Okamura, T.; Miura, T.; Kimura, M.; Mogami, K.; Todoroki-Ikeda, N.; Kobayashi, S.; Matsuzaki, M. Phosphorylation of proteins and apoptosis induced by c-Jun N-terminal kinase I activation in rat cardiomyocytes by H₂O₂ stimulation. **Biochimica et Biophysical Acta**, v 1540, p. 213-220, 2001.
- Moreira, R.A. & Cavada, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis*. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biol. Plantarum**, v 26, p. 113-120, 1984.
- Moreira, R.A.; Cordeiro, E.F.; Grangeiro, T.B.; Martins, J.L.; Ramos, M.V.; Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**, v 8, p. 23-29, 1996.
- Neill, E.O. & Kolch, W. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/Mek signaling pathway. **British Journal of Cancer**, v 90, p. 283-288, 2004.
- Nestler, E.J. & Greengard, P. Serine and threonine phosphorylation. **Basic Neurochemistry**, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 472-495, 1999.
- Ng, D.C.H. & Bogoyevitch, M.A. The mechanism of heat shock activation of ERK mitogen-activated protein kinases in the interleukin 3-dependent ProB cell. **The Journal of Biological Chemistry**. v.275, n.52, p.40856-40866, 2000.
- Ohta, S.; Inazu, T.; Taniguchi, T.; Nakagawara, G.; Yamamura, H. Protein-tyrosine phosphorylations induced by concanavalin A and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. **Eur. J. Biochem.**, v 206, p.895-900, 1992.
- Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda*. **Revta brasil Bot**, v 14, p. 61-66, 1991.
- Orban, P.C.; Chapman, P.F.; Brambilla, R. Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term memory formation. **Trends in Neuroscience**, v 22, p.38-44, 1999.
- Pani, G.; Colavitti, R.; Borrello, S.; Galeotti, T. Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. **Biochem J**, v 347, p.173-181, 2000.
- Park, R.; Kim, M. S.; So, H. S.; Jung, B. H.; Moon, S. R.; Chungf, S. Y.; Ko, C. B.; Kim, B. R.; Chung, H. T. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1(JNK 1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Biochem. Pharmacol.**, v 60, p. 1685-1691, 2000.
- Partin, K.M.; Patneau, D.K.; Winters, C.A., Mayer, M.L.; Buonanno, A. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. **Neuron**, v 11, p. 1069-1082, 1993.
- Perillo, N.G.; Pace, K.E., Seilhamer, J.J.; Baum, L.G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, v 378, p. 736-739, 1995.

- Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable **Analytical Biochemistry**, v.83, p.346-356, 1977.
- Pereira, D.B.; Carvalho, A.P.; Duarte, C.B. Non-specific effects of the MEK inhibitors PD098,059 and UO126 on glutamate release from hippocampal synaptosomes. **Neuropharmacology**, v 42, p. 9-19, 2002.
- Phelan, P. & Gordon-Weeks. Widespread distribution of synaptophysin, a synaptic vesicle glycoprotein, in growing neurites and growth cones. **Eur J Neuroscience**, v 11, p.1180-1190, 1992.
- Pozdnyakova, N.G.; Storchak, L.G.; Himmelreich, N.H. α -Latrotoxin-stimulated protein phosphorylation in rat brain synaptosomes. **Biochemistry**, v 61, n°9, p. 1132-1138, 1996.
- Ramesh, G.T.; Manna, S.K.; Aggarwal, B.B.; Jadhav, A.L. Lead activates nuclear transcription factor- κ B, activator protein-1, and amino-terminal c-Jun kinase in pheochromocytoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v 155, p.280-286, 1999.
- Rodnight, R.; Zamani, R; Tweedale, A. An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat by two-dimensional electrophoresis. **Journal of Neuroscience Methods**. v.24, p.27-38, 1988.
- Rodriguez, D.; Cavada, B.S.; Oliveira, J.T.A.; Moreira, R.A.; Russo, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/manose binding plant lectins. **Braz. J Med Biol Res**, v 25, p.823-826, 1992.
- Rossowska, M. & Khachatryan, L. Effect of modification of synaptosomal membrane glycoprotein on adenylate cyclase activity. **Neurochem Res.**, v 10, p. 1069-1076, 1980.
- Sánchez-Prieto, J.; Budd, D.C.; Herrero, I.; Vázquez, E.; Nicholl, D.G. Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. **Tins**, v 19, p. 235-239, 1996.
- Sanz-Aparício, J.; Hermoso, J.; Granjeiro, T.B.; Calvete, J.J.; Cavada, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v 405, p. 114-118, 1997.
- Scherer, W.J. & Udin, S.B. Concanavalin A reduces habituation in the tectum of the frog. **Brain Res.**, v 667, p.209-215, 1994.
- Shumacher, U.; Feldhaus, S.; Mengs, U. Recombinant mistletoe lectin (rML) is successful in treating human ovarian cancer cell transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice. **Cancer Lett.**, v 150, p. 171-175, 2000
- Seeburg, P.H. The TINS/TIPS lecture - The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. **Trend Neurosci**, v 16, p.359.

- Segovia, G.; Porras, A.; Del Arco, A.; Mora, F. Glutamatergic transmission in aging: a critical perspective. *Mechan. Aging Develop*, v. 122, p. 1-29, 2001.
- Sharon, N & Lis, H. **Lectins**, Chapman and Hall, London, 1989.
- Suen, Y.K., Fung, K. P., Choy, Y. M., Lee, C.Y., Chan, C.W.; Kong, S.K. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. **Apoptosis**, v 5, p.369-377, 2000.
- Sugita, S.; Ichtchenko, K.; Khvotchev, M.; Südhof, T.C. α -Latrotoxin receptor CIRL/latrophilin I (CLI) defines an unusual family of ubiquitous G-protein-linked receptors. G-protein-coupling not required for triggering exocytosis. **J Biol Chem**, v 273, p. 32715-32724, 1998.
- Sundstrom, C.; Nilsson, K. Establishment and characterization of human histiocytic lymphoma cell line (U-937). **International Journal of Cancer**, v. 17, p. 565-577. 1976.
- Sweatt, J.D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **Journal of Neurochemistry**, v 76, p.1-10, 2001.
- Sweatt, J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. **Current Opinion in Neurobiology**, v 14, p.1-7, 2004.
- Tadlock, L. & Patel, T. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in transformed growth of a cholangiocarcinoma cell line. **Hepatology**, v 33, p.43-51, 2001.
- Takenaka, K.; Moriguchi, T.; Nishida, E. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. **Science**, v 280, p.599-602, 1998.
- Thalhammer, A.; Everts, I.; Hollmann, M. Inhibition by lectins of glutamate receptor desensitization is determined by lectin's sugar specificity at kainate but not ampa receptors. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 21, p.521-533, 2002.
- Thomas, G.M. & Huganir, R.L. MAPK cascade signaling and synaptic plasticity. **Nature Reviews**, vol 5, p. 173-183, 2004.
- Tang, H.; Nishishita, T.; Fitzgerald, T.; Landon, E.J.; Inagami, T. Inhibition of AT1 receptor internalization by concanavalin A blocks angiotensin II-induced ERK activation in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v 275, p.13420-13426, 2000.
- Trigueros, V.; Lougarre, A.; Ali-Ahmed, D.; Rahbé, Y.; Guillot, L.C.; Fournier, D.; Paquereau, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of new pesticidal protein. **Biochimica and Biophysica Acta**, v 1621, p. 292-298, 2003.
- Uehara, T.; Kaneko, M.; Tanaka, S.; Okuma, Y.; Nomura, Y. Possible involvement of p38 MAP kinase in HSP70 expression induced by hypoxia in rat primary astrocytes. **Brain Research**. v.823, p.226-230, 1999.

- Ushkaryov, Y.A.; Petrenko, A.G.; Geppert, M.; Südhof, T.C. Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the α -latrotoxin receptor and laminin. **Science**, v 257, p. 50-56, 1992.
- Vasconcelos, I.M.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A. **Journal of Food Biochemistry**, v 15, p.137-154, 1991.
- Wang, Y.Z. & Bonner, J.C. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase ERK-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v.22, p.590-596, 2000
- Wan Ko, H.; Han, K.S.; Kim, E.Y.; Ryer, B.R.; Yoon, W.J.; Jung, Y.K., Kim, S.U.; Gwag, B.J. Synergetic activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3-like proteases for execution of calyculin A-induced apoptosis but not N-methyl-D-aspartate-induced necrosis in mouse cortical neurons. **Journal of Neurochemistry**, v 74 n°6, p. 2455-2461, 2000.
- Westerink, R.H.S. Exocytosis: using amperometry to study presynaptic mechanisms of neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v 25, p. 461-470, 2004.
- Wilsbacher, J.L.; Goldsmith, E.J.; COBB, M.H. Phosphorylation of MAP kinases by MAP/ERK involves multiple regions of MAP kinases. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, n.24, p.16988-16994, 1999.
- Yue, K.T.; Macdonald, J.F.; Pekhletski, R.; Hampson, D.R. Differential effects of lectins on recombinant glutamate receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v 291:229-235, 1995.